

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD — LYON —

U.E.R de Médecine LYON Sud-Ouest

Année 1977

N° 122

Méthodes d'étude du métabolisme du tissu conjonctif

T H E S E

présentée et soutenue publiquement le 23 mars 1977

par

Jean-Marie LAMOULERE

né le 9 mai 1948

à BOURG-EN-BRESSE (Ain)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE

Année 1977

N° 122

METHODES D'ETUDE DU METABOLISME DU TISSU CONJONCTIF

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement le 23 Mars 1977

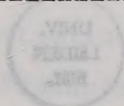
par

Jean-Marie LAMOULERE

Né le 9 Mai 1948

à BOURG EN BRESSE (Ain)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE



Examineurs de la thèse :

Monsieur le Professeur

Monsieur le Professeur

Monsieur le Professeur Agrégé

Monsieur le Professeur

M. PLAUCHU Président

F. TOLOT

P. MEUNIER

G. RIFFAT

Assesseurs



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

=====

Président	M. le Professeur D. GERMAIN
Premier Vice-Président	M. le Professeur EL BAZ
Deuxième Vice-Président	M. P. PONCET, Maître-Assistant
Troisième Vice-Président	M. M.H. BONNET, Etudiant
Secrétaire Général de l'Université	M. J. RAMBAUD, Administrateur civil

Unités d'Enseignement et de Recherche (U.E.R.)

U.E.R. de Médecine GRANGE-BLANCHE	M. le Docteur B. SALLE, Maître de Conférences
U.E.R. de Médecine ALEXIS-CARREL	M. le Professeur R. MORNEX
U.E.R. de Médecine LYON-NORD	M. le Docteur J.P. NEIDHARDT, Maître de Conférences
U.E.R. de Médecine SUD-OUEST	M. le Professeur J. NORMAND
U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques	M. le Professeur L. ODDOUX
U.E.R. des Techniques de Réadaptation ...	M. A. MORGON, Maître de Conférences
U.E.R. de Biologie Humaine	M. le Docteur REVILLARD, Maître de Conférences
U.E.R. d'Education Physique et Sportive .	M. A. MILLON, Professeur d'E.P.S.
U.E.R. des Sciences Odontologiques	M. le Docteur R. VINCENT
U.E.R. de Mathématiques	M. le Professeur H. BUCHWALTER
U.E.R. de Physique	M. le Professeur R. UZAN
U.E.R. de Chimie et Biochimie	M. le Professeur J. HUET
U.E.R. des Sciences de la Nature	M. le Professeur J. BRUN
U.E.R. des Sciences Physiologiques	M. R. FONTANGES, Maître de Conférences
U.E.R. de Physique Nucléaire	M. le Professeur A. SARAZIN
U.E.R. de Mécanique	M. le Professeur J. MATHIEU
Observatoire de Lyon	M. le Professeur J.H. BIGAY
I.U.T. 1	M. le Professeur B. POUYET
I.U.T. 2	M. J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

=====

U.E.R. DE MEDECINE LYON SUD-OUEST

PROFESSEURS TITULAIRES

MM. AIMARD Gilbert	Neurologie
BRUN Jacques	Clinique Pneumo-Phtisiologique
COLOMB Daniel	Dermatologie
GIRARD Paul	Clinique Neuro-Psychiatrique et d'Hygiène Mentale
GUILLEMIN Georges	Clinique Chirurgicale
LATARJET Michel	Clinique Chirurgicale
MAYER Marcel	Cancérologie
NORMAND Jean	Cardiologie
NOTTER Armand	Gynécologie Obstétrique
PINET Edouard	Radiologie
PLAUCHU Marcel	Endocrinologie et Médecine Interne
ROBERT Jacques	Chaire de Génétique Médicale
TOLOT François	Médecine Interne - Médecine du Travail
VACHON Alphonse	Clinique Médicale - Maladies de l'appareil digestif
VINCENT Daniel	Chaire de Biochimie appliquée

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. BRAILLON Georges	Anatomie
GILLY Robert	Pédiatrie
LAPRAS Claude	Neuro-Chirurgie
LOUISOT Pierre	Biochimie
MORET Robert	Biophysique
PERRIN FAYOLLE Max	Pneumo-Phtisiologie
SITE Jean	Mathématiques - Statistiques - Informatique
VIALIER-RAYNARD Jean	Bactériologie - Virologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. ARCHIMBAUD Jean-Pierre	Urologie
BERARD Philippe	Chirurgie Générale
BERTRAND Jean-Louis	Maladies Infectieuses
Mme BONNET Mireille	Ophtalmologie
MM. BOUVIER Maurice	Rhumatologie
CABANAC Michel	Physiologie
CROISILLE Marc	Radiologie
DE VILLARD Régis	Neuro-Psychiatrie
DUBOIS Paul	Histologie
HAGUENAUER Jean-Paul	O.R.L.
JEANNEROD Marc	Médecine Expérimentale
JOUVENCEAUX André	Hémobiologie
LAIR Jacques	Stomatologie
LEVRAT Roger	Médecine Interne
LOMBARD PLATET Roger	Séméiologie Chirurgicale
MICHEL Albert	Anesthésiologie
MOLLARD Pierre	Chirurgie Infantile
PALIARD Pierre	Séméiologie Médicale
REBOUILLAT Jacques	Chirurgie Générale
REVILLARD Jean-Pierre	Néphrologie
ROCHET Michel	Anatomie Pathologique
ROMAGNY Gabriel	Pédiatrie
TERMET Hubert	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
TETE Roger	Médecine Interne
THOULON Jean-Marie	Gynécologie Obstétrique
TOUBOUL Paul	Cardiologie
TRILLET Marc	Neurologie

J E D E D I E C E T R A V A I L :

A MES PARENTS,

en témoignage de la profonde reconnaissance
que je leur dois

A MA FEMME,

A MA FILLE,

A MA FAMILLE,

A MES AMIS.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. PLAUCHU

qui me fait l'honneur de présider le jury de
cette thèse.

Je le remercie pour la valeur de l'enseignement
qu'il nous a dispensé avec rigueur et compétence.

Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse
considération.

AUX MEMBRES DU JURY

MONSIEUR LE PROFESSEUR FRANCOIS TOLOT

Pour la bienveillance et l'enseignement duquel j'ai
une sincère reconnaissance. Qu'il trouve ici le té-
moignage de mon profond respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGÉ PIERRE MEUNIER

Dont je sais la science et la grande expérience et
que je remercie respectueusement d'avoir bien voulu
accepter cette tâche.

MONSIEUR LE PROFESSEUR GEORGES RIFFAT

qui a su me montrer l'intérêt de la rhumatologie.
Je lui en garde une extrême gratitude.

A MONSIEUR LE DOCTEUR JEAN-BERNARD EISINGER

qui a bien voulu me confier ce travail et dans le Service
duquel j'ai pu le réaliser. Je le prie d'accepter l'expression
de ma profonde gratitude et de ma respectueuse considération.

A MES MAITRES DES HOPITAUX

MONSIEUR LE PROFESSEUR MICHEL

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGÉ CROISILLE

MONSIEUR LE PROFESSEUR CHASSAGNON

dont j'ai eu l'honneur d'être l'étudiant

QU'IL ME SOIT PERMIS DE TÊMOIGNER MA RECONNAISSANCE A

MONSIEUR LE DOCTEUR VIALLAT

dont j'ai pu apprécier l'enseignement et la compréhension
lors de mon premier choix d'Interne. J'ai
été très sensible à la bienveillante amitié qu'il
m'a toujours témoigné. Qu'il soit assuré de mon respectueux
attachement.

MONSIEUR LE DOCTEUR QUILICHINI

qui m'a prodigué sans réserve son enseignement et
dont la science et l'extrême cordialité lui valent
mon plus profond respect

MONSIEUR LE DOCTEUR EISINGER

auprès desquels j'ai eu l'honneur d'exercer la fonction
d'Interne.

A CEUX QUI ONT CONTRIBUE A CE TRAVAIL :

Monsieur le Docteur AYAVDOUX

Monsieur le Docteur BERNARD

Monsieur MARIE, Pharmacien

Les Internes de l'Hôpital Chalucet

Madame E. GAUB

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

LE COLLAGENE

- Définition
- Morphologie et structure
- Métabolisme

L'ELASTINE

- Structure
- Métabolisme
- Propriétés physico-chimiques

LES GLYCOPROTEINES DE STRUCTURE

- Définition
- Composition et biosynthèse
- Propriétés

LES GLYCOSAMINOGLYCANES

- Définition
- Structure et classification
- Propriétés de la liaison osidique
- Métabolisme
- Propriétés physico-chimiques

DEUXIEME PARTIE

EXPLORATION DU METABOLISME DU COLLAGENE

Exploration du métabolisme du collagène in vitro

Exploration du métabolisme du collagène in vivo

- Proline hydroxylase
 - A - Structure et action
 - B - Technique d'étude
 - C - Variations pathologiques
- Lysyl hydroxylase
- Lysyl oxydase
- Proline iminopeptidase
- Proline
- Hydroxylysine
 - . Dosage
 - . Glycosides de l'hydroxylysine
- Hydroxyproline
 - I - Introduction
 - II - Structure chimique et métabolisme
 - III - Physiologie de l'hydroxyproline
 - IV - Les hypropeptides urinaires
 - V - Signification de l'hydroxyproline par rapport au collagène
 - VI - Dosage de l'hydroxyproline
- Variations pathologiques de l'élimination urinaire
 - I. - Maladies des os et du tissu conjonctif
 - II - Affections endocriniennes
 - III - Collagénoses, dermatoses
 - IV - Maladies et états pathologiques divers
 - V - Thérapeutique pouvant influencer l'hydroxyprolinurie
- Intérêts pratiques de l'étude de l'hydroxyprolinurie
- Etude de l'hydroxyproline libre
- Etude qualitative des hypropeptides urinaires

ETUDE DU METABOLISME DE L'ELASTINE

- Méthodes d'étude
- Intérêt en pathologie

ETUDE DU METABOLISME DES GLYCOSAMINOGLYCANES

I - Exploration de la synthèse

II - Etude de la dégradation

A - Les glycosaminoglycanes urinaires

1 - Techniques d'étude

2 - Etude de la mucopolysaccharidurie normale

3 - Variations pathologiques

I - Les mucopolysaccharidoses

II - Les mucolipidoses

B - Cultures de cellules

C - Les enzymes lysosomiales

1 - Dosage de la NAG

2 - Dosage de la glycuronidase

3 - Résultats

4 - Variations en pathologie - Revue générale

5 - Etude des variations de l'élimination en pathologie (nos travaux)

RESUME

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE COMPLEMENTAIRE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

=====

Le tissu conjonctif, d'origine mésenchymateuse, est présent dans un grand nombre de tissus très spécialisés et très différents comprenant le cartilage, les ligaments, les tendons, les fascias, une partie de la peau, des valves cardiaques, des parois des vaisseaux, de l'os. Il intervient, par là même, dans diverses pathologies et intéresse donc de nombreuses spécialités médicales.

La biochimie de ce tissu connaît depuis une dizaine d'années un essor considérable. Les spécialistes du tissu conjonctif ont ainsi permis une meilleure connaissance de sa composition, de son métabolisme et de la physiopathologie de nombreuses affections, modifiant considérablement les données classiques; parallèlement, leurs diagnostics et la surveillance thérapeutique bénéficient de nouvelles techniques d'études.

Le but de ce travail était de décrire et de regrouper ces différentes techniques d'étude analysées dans la littérature, tout en essayant de montrer leur application en pathologie.

Cependant, l'importance des recherches dans ce domaine ne nous étant apparue que progressivement, il est certain que cette étude ne peut servir que de point de départ.

Nous nous proposons d'étudier dans une première partie les protéines fibrillaires et les glycosaminoglycanes du tissu conjonctif. La deuxième partie sera consacrée aux principales techniques utilisées pour chacune des quatre macromolécules essentielles et à leurs applications en pathologie. Nous étudierons particulièrement les techniques et les résultats des examens de pratique courante ou semi-courante, c'est-à-dire pour l'analyse du collagène : l'hydroxyproline et pour celle des glycosaminoglycanes : la mucopolysaccharidurie, les autres étant réservées aux laboratoires de recherches.

Dans le chapitre des techniques d'étude des glycosaminoglycanes, nous ferons part de notre travail sur une enzyme lysosomiale de dégradation : la N-acétyl-bêta-glucosaminidase dans les urines de malades du service du Docteur EISINGER, travail réalisé grâce à la collaboration du Docteur AYAVOUX et de son laboratoire.

PREMIERE PARTIE

=====

Les tissus conjonctifs, qui présentent diverses adaptations fonctionnelles, sont constitués :

- de cellules caractéristiques (fibroblastes ou éléments de différenciation comme les ostéocytes, chondrocytes, etc...) qui sécrètent des protéines particulières qui constituent

- des protéines fibrillaires insolubles : collagène, élastine noyées dans

- une substance fondamentale constituée essentiellement de protéoglycanes : association de protéines avec des mucopolysaccharides.

Nous nous intéresserons essentiellement aux quatre macromolécules principales :

- . Collagène
- . Elastine
- . Mucopolysaccharides
- . Glycoprotéines de structure

LE COLLAGENE

=====

DEFINITION

Le collagène est une scléroprotéine.

Il est présent dans les espaces intercellulaires et est un des grands constituants de la trame conjonctive. Il constitue la plus abondante protéine du corps. Par contact avec la chaleur et en présence d'eau, il se transforme en gélatine.

Selon le type du tissu conjonctif, le métabolisme du collagène a lieu pour une grande part à l'extérieur des cellules.

Secrétées par les fibroblastes ou par les cellules différenciées analogues, et relâchées dans les espaces intercellulaires, les molécules de collagène s'agrègent pour former des fibrilles. Plus un tissu est riche en fibres de collagène, plus il est résistant.

MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DU COLLAGENEA - MORPHOLOGIE

En microscopie électronique, la fibre du collagène (20 microns de diamètre) aperçue en coupe histologique, est composée d'un assemblage latéral de fibrilles, elles-mêmes constituées de filaments (2.000 Å) et protofibrilles (200 Å). Elles possèdent une striation transversale qui est caractéristique. La longueur d'une période (ensemble représenté par une bande sombre et une claire) est de 640 Å pour le collagène de tissu adulte.

B - STRUCTURE

La molécule du collagène (glycoprotéine) est constituée par un assemblage de 3 chaînes polypeptidiques enroulées en hélice autour d'un axe central. Chaque chaîne possède des caractéristiques spécifiques. Il existe entre elles des liaisons non covalentes ou covalentes. Les chaînes ainsi assemblées forment un bâtonnet de 3.000 Å de long et de 12 Å de diamètre, de poids moléculaire 300.000. Les bâtonnets, en s'arrangeant par superposition et décalage de 1/4 de leur longueur, constituent les microfibrilles.

Les différents génotypes de collagène et leur distribution tissulaire d'après UITTO (97) :

"		Chaîne α_1	α_2	Organe	"
"	1ère	(I) ₂	1	Peau - Tendon - Os	"
"				Augmente dans les fibroses	"
"	2ème	(II) ₃	-	Cartilage articulaire	"
"	3ème	(III) ₃	-	Aorte (40% du total)	"
"				Derme papillaire	"
"				Intestin	"
"	4ème	(IV) ₃	-	Membrane basale	"
"					"

1 - LES ACIDES AMINES

La glycine est proportionnellement l'acide aminé le plus important (30%). L'alanine, la proline, l'hydroxyproline représentent 1/4 à 1/3 des acides aminés (l'hydroxyproline se trouve uniquement dans le collagène et un peu dans l'élastine). On remarquera aussi la présence dans le collagène d'un autre acide aminé hydroxylé : l'hydroxylysine dont la teneur varie avec l'origine et l'état physiologique des tissus. Par contre, sont absents du collagène le tryptophane, la cystine (Cf. tableau).

Dans le cadre de l'étude du métabolisme du collagène, sa composition en acides aminés permet de souligner plusieurs particularités :

- la présence d'hydroxylysine et d'hydroxyproline alors qu'il en existe très peu dans les autres protéines
- le taux important de glycine, dont l'étude de l'incorporation par la glycine marquée sera intéressante pour la connaissance du métabolisme du collagène.

2 - CARBOHYDRATES

Le collagène contient entre 0,5 et 1,5% d'hexoses, généralement glucose et galactose.

3 - STRUCTURE

- La structure primaire est formée par l'enchaînement des acides aminés suivant une séquence définie et relativement stable, mais d'étude difficile.
- La structure secondaire est une hélice de pas à gauche.
- La structure tertiaire est une triple hélice maintenue par des liaisons hydrogènes perpendiculairement à l'axe de la molécule.
- La structure quaternaire constitue des fibrilles. Elle est déterminée par l'emplacement des acides aminés basiques et acides le long de la chaîne.

Gly										
Ala			Pro			Hypro				
Glu			Asp		Ser		Thr			
Arg		Lys	Hylys	Hist	Val	Leu	Ileu	Met	Phe	Tyr

COMPOSITION EN ACIDES AMINES. D'après VALLET et coll. (99)

On distingue :

- Le protocollagène et le procollagène, précurseurs intrafibroblastiques du tropocollagène
- Le tropocollagène dont les molécules au début sont liées peu solidement et de manière réversible constituant ainsi les formes solubles de collagène (en particulier le collagène neutrosoluble)

Après formation de liaisons croisées, les fibres deviennent plus solides.

- Le collagène insoluble mature

Le rapport collagène insoluble/collagène soluble est lié à la résistance à la traction.

C - PROPRIETES

La structure du collagène lui confère des propriétés physiques particulières (79) : diffraction des rayons X, pouvoir rotatoire optique, birefringence, dispersion caractéristique de la lumière, rétraction à 65°.

La chaleur en présence d'eau par exemple modifie le collagène et le dénature. Les modifications de certaines propriétés physiques permettent d'évaluer cette dénaturation.

METABOLISME DU COLLAGENE

A - ANABOLISME (LOUISOT) (62)

La biosynthèse du collagène comporte une succession d'étapes, d'abord intracellulaires, puis extracellulaires.

1 - Pendant la phase intrafibroblastique, les étapes sont les suivantes :

- Biosynthèse d'un précurseur polypeptidique pour chaque chaîne séparément au niveau des polysomes liés aux membranes du réticulum endoplasmique, grâce à des gènes de structure différents.

Les précurseurs contiennent du côté N terminal, des "peptides de coordination" ou "peptides de registration" qui comportent de la cystéine et du tryptophane (absents du collagène mature) et qui relient par des ponts disulfure les chaînes ainsi formées et facilitent leur enroulement en triple hélice. Ainsi est formée la molécule de procollagène.

- Hydroxylations, parallèlement, (14) des résidus lysyl et prolyl par respectivement la lysine-hydroxylase et la proline-hydroxylase.

Ces enzymes sont synthétisées sous forme de précurseurs et doivent être activées. Les études pratiquées par l'équipe de FREY-FARJANEL au laboratoire de biochimie de ST ETIENNE (31) montrent que par plusieurs mécanismes le calcium inhibe l'activité globale de la proline-hydroxylase et ainsi la synthèse du collagène.

L'hydroxylation de la proline (comme de la lysine) ne porte que sur la proline incluse dans des séquences peptidiques et non sur la proline libre. Cette hydroxylation est indispensable car les peptides non hydroxylés s'accumulent dans les cellules et sont dégradés secondairement.

De la présence d'ion Fe^{2+} , d'acide ascorbique, d'alpha-cetoglutarate et d'oxygène moléculaire, dépend le fonctionnement de l'enzyme. L'ion Fe^{2+} et l'alpha-cetoglutarate sont indispensables. Le rôle de l'acide ascorbique est plus difficile à interpréter : sa place dans le complexe d'hydroxylation apparaît plausible. Cependant KIVIRIKKO en 1970 (55) a purifié l'enzyme procollagène-hydroxylase et a constaté qu'elle fonctionnait sans vitamine C. Mais il est possible aussi que l'acide ascorbique intervienne dans l'agrégation des monosomes en polysomes.

- Glycosylation : le collagène est une glycoprotéine; la mise en place des chaînons glucidiques sur le polypeptide fait intervenir des mécanismes de transglycosylation.

.../...

La glycosylation va s'effectuer, pour le cas du galactose, au niveau des résidus hydroxylysines à environnement peptidique convenable et en fonction de l'âge et des régulations hormonales pour le cas du glucose. En effet, sur les molécules d'hydroxylysines se fixent, successivement, du galactose, puis du glucose, pour former de la galactosyl-hydroxylysine et de la glucosyl-galactosyl hydroxylysine.

Les glycosyl-transférases impliquées dans le processus sont la galactosyl-transférase et la glucosyl-transférase.

Les glycosyltransférases, qui participent à la synthèse du collagène mais aussi à celle "de molécules d'intérêt biologique" comme les gammaglobulines, glycolipides cérébraux, prennent une importance croissante tant en biologie qu'en pathologie - LOUISOT (61).

Il y a compétition entre les glycosylations et la formation de liaisons croisées sur les résidus d'hydroxylysine.

- Restriction du précurseur du côté N terminal, grâce à l'action d'une procollagène-peptidase. Son action se situe sur la structure tricaténaire déjà constituée.

2 - Phase extra-fibroblastique

Le procollagène hydroxylé et glycosylé, amputé de ses peptides de stabilisation franchit la membrane plasmique : c'est le tropocollagène.

Il s'agrège par réticulation aux fibres de collagènes déjà formées ou avec d'autres molécules de tropocollagène.

Dans la mise en place des ponts interchaînes, la lysine, après avoir subi une désamination oxydative, joue un rôle très important. L'enzyme de cette réaction est la lysyl-oxydase, enzyme inhibée par les lathyrogènes (dont le chef de file est le bêta amino-propionitrile) et nécessite la présence de Cu^{2+} et de piridoxal. L'actinomycine D déprime de 10% l'activation par le cuivre de l'enzyme. C'est le facteur clef de l'activité de l'enzyme (A noter que cette enzyme est active aussi sur l'élastine (HARRIS - 44)).

- La lysine est transformée en allysine.

- Les liaisons croisées intermoléculaires se constituent ainsi principalement entre lysine, hydroxylysine, allysine, hydroxyallysine. La plus importante est dans la peau, l'aldimine, et dans les tendons : la syndésine (allysine - hydroxyallysine).

La formation des pontages est inhibée par la pénicillamine (28 de LOUISOT).

- Les pontages intermoléculaires ("cross-links") modifient la solubilité des fibrilles et des fibres de collagène ainsi formées. Ils sont à la base de la résistance mécanique.

- Les protéoglycanes et les glycoprotéines de structure interviennent dans ce processus de fibrillogénèse en l'accéléralant, le retardant, le modifiant. Ils peuvent former des agrégats avec les molécules de tropocollagène. Ces interactions ont un rôle important dans la fibrillogénèse, sa régulation, son orientation (86).

Il semble, pour BAILEY en 1975 (10) qu'il existe une spécificité tissulaire dans le pontage du collagène. Il se peut qu'une lysine hydroxylase spécifique joue un rôle dans la variation des types de liaisons pontiques dans les différents tissus en créant un degré d'hydroxylation variable au niveau des résidus lysine des régions NH_2 et COOH terminales (degré très faible dans le derme, très élevé dans le cartilage et l'os) (9) (10).

Les récents résultats fondamentaux obtenus dans l'étude des mécanismes de pontage ont montré que certaines maladies héréditaires du tissu conjonctif pouvaient être reliées à des défauts dans ce mécanisme. L'étude du syndrome d'EHLERS-DANLOS, du syndrome de MARFAN et de l'ostéogénèse imparfaite, suggère que le tissu conjonctif est moins résistant que dans son état normal (10).

3 - Régulation de la synthèse du collagène (62)

Outre les facteurs génétiques, métaboliques, la régulation de la synthèse du collagène dépend de facteurs hormonaux.

La synthèse est augmentée par l'insuline, le salicylate de Na (94), la S.T.H. (action sur la biosynthèse des chaînes de procollagène et la maturation des fibres de tropocollagène). Les hormones mâles, les anabolisants de synthèse, la thyrocalcitonine activent le premier stade de la biosynthèse. Les vitamines C et B augmentent aussi la synthèse.

La synthèse est diminuée par les corticoïdes, la progestérone, la vitamine E, la phénylbutazone (94).

L'hydroxylation est diminuée par une carence en vitamine C, les chélateurs, les analogues de la proline alors qu'elle est augmentée par la diphénylhydantoïne.

La polymérisation est diminuée par les lathyrogènes, le Zn, la pénicillamine et la cystéamine; cet effet est combattu par le salicylate et l'oestradiol.

B - DEGRADATION DU COLLAGENE

La dégradation du collagène, qui fait l'objet d'un renouvellement régulier, fait intervenir des systèmes enzymatiques spécifiques et des protéases tissulaires.

- Les collagénases : les premières collagénases identifiées sont d'origine bactérienne (clostridia).

Elles ont été retrouvées dans les tissus humains par mise en culture de cellules.

Il existe une pro-enzyme qui doit être activée (le calcium est nécessaire, la cystine inhibitrice) (79).

Elles agissent à pH voisin de la neutralité en hydrolysant le collagène natif. Le point d'attaque semble être une séquence (gly-pro-Y)_n. Le clivage est facilité par la conformation en hélice car le collagène dénaturé ou gélatine est seulement lentement clivé par cette enzyme.

Elles sont inhibées par alpha 1 antitrypsine et alpha 2 macroglobuline.

Il existe probablement plusieurs collagènes de spécificités différentes.

- Les hydrolases acides lysosomiales ne sont pas spécifiques au contraire des collagénases. On les trouve en abondance dans les tissus où se résorbe le collagène : utérus après parturition, foyers inflammatoires.

Il s'agit de protéases du groupe des cathepsines, principalement de la cathepsine collagénolytique qui dégrade le collagène natif soluble et insoluble en pH acide.

Différents facteurs interviennent au niveau de la dégradation du collagène. Ainsi, la parathormone, les hormones thyroïdiennes et l'E.D.T.A. augmentent cette dégradation. Les stabilisateurs des lysosomes (cortisone, antimalarique) la diminuent.

L'action sur le catabolisme du collagène des antirhumatismaux non stéroïdiens est variable (94). Ainsi, sur les animaux sains, le salicylate de sodium augmente le catabolisme du collagène soluble alors que dans le lathyrisme et l'artrite expérimentale où le catabolisme du collagène soluble est très augmenté, ce produit normalise cette dégradation. D'autre part, la phénylbutazone ne modifie pas le catabolisme du collagène. La chloroquine augmente par contre le catabolisme du collagène nouvellement synthétisé.

Les fibres du collagène sont dégradées en polypeptides plus ou moins volumineux et éliminés par voies urinaires.

C - TURN OVER DU COLLAGENE

Les fibres du collagène font l'objet, donc, d'un renouvellement régulier et il existe plusieurs variétés de collagène en rapport avec des vitesses de renouvellement différentes.

LINDSTEDT et PROCKOP (19 de 13) trouvent la preuve de l'existence d'au moins 3 pools métaboliques différents de l'hydroxyproline, avec des demi-vies de 1,5 et 50 à 100 jours.

- Les pools de demi-vie courte sont rattachés au collagène soluble métaboliquement actif et contribuent le plus à la production de peptides urinaires à hydroxyproline. Ils témoigneraient d'une synthèse accrue du collagène.

- Les pools de longue demi-vie correspondraient au collagène insoluble. Cinq à dix pour cent sont éliminés dans les urines et il faut une importante dégradation du collagène pour avoir des modifications de l'hydroxyproline urinaire.

- Le turn-over du collagène insoluble varie d'organe à organe, de tissu à tissu. Faible pour le tendon, il est presque rapide pour le tissu osseux et la peau. De même, il varie avec l'âge, étant plus rapide chez les sujets jeunes que chez les sujets adultes.

La résistance à la dépolymérisation lors du vieillissement (solubilisation à 100% du collagène du tendon de nouveau-né, à 2% vers 25 ans) est due à l'augmentation du nombre des liaisons croisées du collagène (19 de 101). Le pool de collagène à renouvellement rapide diminue avec l'âge.

Le collagène de turn-over lent serait celui des tissus normalement stables. Celui à turn-over rapide serait abondant dans les organes dont la fonction est liée à une croissance accélérée suivie de résorption (utérus) et dans les tissus de réparation (plaies) (86 de 13).

La carence en vitamine C provoque pratiquement de manière totale une inhibition de la biosynthèse du collagène à turn-over rapide (plaies cutanées) n'influençant pas celle du collagène à turn-over lent (peau en croissance) (86 de 13).

Le processus de synthèse et de dégradation de ces deux types de collagène serait donc différent.

SYNTHESE DU COLLAGENE

=====

"	"	"
"	SYNTHESE AUGMENTEE	SYNTHESE DIMINUEE
"	-----	-----
"	Salicylate de Na	Corticoïdes
"	Insuline	Progestérone
"	S.T.H.	Vitamine E
"	Vitamine B	Phénylbutazone
"	Vitamine C	
"	Carence en vitamine D	
"	Hormone thyroïdienne	
"	Hormone mâle	
"	Anabolisants de synthèse	

"	"	"
"	HYDROXYLATION	POLYMERISATION
"	-----	-----
"	<u>Diminuée</u> : <u>Augmentée</u>	
"	-----	Diminuée par les lathyrogènes
"	-Carence Vit. C : Diphénylhy-	et la pénicillamine, effet
"	-Chélateurs : dantoïne	combattu par le Salicylate,
"	-Analogue de la :	l'oestradiol
"	proline :	
"	-Vitamine A :	
"	-----	-----

L'ELASTINE

=====

La matrice intercellulaire des tissus conjonctifs différenciés est composée outre du (ou des) collagène, des protéoglycanes et des glycoprotéines de structure, de l'élastine. Une régulation précise de la vitesse relative de synthèse de ces matériaux aboutit à la différenciation et à la morphogénèse des tissus conjonctifs.

Ainsi, l'élastine joue un rôle quantitativement et qualitativement important dans la composition des grosses artères comme l'aorte.

Les études récentes des équipes fundamentalistes et médicales sur la biochimie de l'élastine et des élastases ont permis d'approcher la pathogénèse de l'athérosclérose.

STRUCTURE DE L'ELASTINE (30)

L'élastine est considérée comme une scléroprotéine qui se compose de 18 acides aminés parmi lesquels les plus nombreux (80%) sont les acides aminés apolaires (glycine, valine, proline). Elle renferme également de l'hydroxyproline mais en quantité moindre que le collagène. Sa teneur en acides dicarboxyliques (acide aspartique, acide glutamique) est faible. Comme dans le collagène, la cystine fait défaut.

La composition en acides aminés pour une même espèce est bien définie et constante.

L'élastine peut être facilement caractérisée par l'isolement et le dosage des acides aminés pontiques : la lysine-norleucine, la desmosine et l'isodesmosine. Ils sont responsables de la formation d'un réseau tridimensionnel après maturation de la protéine.

La microscopie électronique montre que les fibres élastiques sont composées de deux éléments :

- des microfibrilles de 110 Å de diamètre
- et de matériel amorphe constitué essentiellement par de l'élastine

Les microfibrilles contiennent de nombreux ponts cystine disulfure alors que l'élastine n'en contient pas. Par rupture des ponts disulfure, les microfibrilles peuvent être solubilisées et se séparent de l'élastine insoluble.

Chez l'embryon, les fibres élastiques sont constituées essentiellement de microfibrilles. Plus tardivement apparaît le matériel amorphe et ainsi chez l'adulte les fibres élastiques sont faites principalement d'élastine.

METABOLISME DE L'ELASTINE (84)

A - Elastigénèse

L'élastigénèse se fait dans les fibroblastes de la peau, des tendons, des ligaments mais aussi dans les cellules musculaires de la paroi des artères (106 a de 63).

"Il apparaît à la suite des travaux récents que l'élastine est synthétisée sous la forme d'une protéine précurseur soluble, la tropo ou pro-élastine dont le poids moléculaire est de l'ordre de 76.000.

La pro-élastine est riche en lysine et possède une forte proportion d'acides aminés non polaires.

Grâce à la charge positive de la lysine, la pro-élastine s'associe dans l'espace intercellulaire avec une trame microfibrillaire constituée de glycoprotéines de structure qui possèdent une charge négative prépondérante.

Après la formation de ces complexes moléculaires, des enzymes spécifiques, des lysyl-oxydases, initieraient la formation de liaisons pontiques en oxydant certains résidus de lysine en acide delta-amino-adipique semi-aldéhyde. Ces aldéhydes réagiraient avec des lysines sur des molécules de pro-élastine voisines pour former les liaisons pontiques du type lysino-norleucine, desmosine-isodesmosine.

Grâce à la charpente microfibrillaire des glycoprotéines de structure, ce phénomène de pontage pourrait être dirigé avec précision dans l'espace. D'autres réactions enzymatiques de nature encore peu étudiée conduisent à la formation de molécules telles que desmosine et iso-desmosine pouvant relier deux, trois ou même quatre molécules de pro-élastine, ainsi responsables de la réticulation tridimensionnelle des lames élastiques concentriques de l'aorte". (84)

L'étude de ces pontages de l'élastine (20) en 1974 a montré leur répartition non homogène. Il existe une distinction entre l'élastine soluble faiblement réticulée et l'élastine hautement réticulée qui renferme des polypeptides riches en desmosine. Les mêmes auteurs ont montré d'autre part que les proportions respectives d'élastine hautement réticulée et faiblement réticulée pouvaient être mises en relation avec la gravité de l'atteinte athéromateuse.

Par ailleurs, il a été démontré récemment que la biosynthèse de l'élastine se continue chez l'adulte (BERRY), biosynthèse que l'on a longtemps niée.

"Ces constatations récentes laissent espérer qu'une régénération du tissu élastique par néosynthèse est dans le domaine du possible et pourrait être éventuellement stimulée par des moyens pharmacologiques". (84)

B - "Programme de biosynthèse des macromolécules de la matrice intercellulaire"

"Le rapport quantitatif des glycoprotéines de structure aux autres macromolécules de la matrice intercellulaire (collagène et élastine en particulier) est caractéristique de chaque tissu et change aussi au cours de l'ontogénèse. Ceci suggère un "programme" de biosynthèse des macromolécules de la matrice intercellulaire qui serait à la base de la différenciation de ces tissus mésenchymateux.

Ainsi, on observe dans le tissu élastique un tel phénomène : les fibres élastiques jeunes sont très riches en glycoprotéine de structure microfibrillaire mais dont la quantité relative par rapport à l'élastine diminue chez l'adulte pour augmenter à nouveau dans l'âge avancé et encore plus dans l'artériosclérose.

Ainsi, le rapport de ces deux constituants macromoléculaires de la paroi artérielle permet de calculer un âge théorique pour la paroi et permet ainsi de chiffrer l'avancement de l'âge dans une paroi artérielle pathologique". (84)

C - Elastolyse

"L'élastine est résistante à l'action de la plupart des protéases, mais elle est attaquée sélectivement par les enzymes protéolytiques communément dénommées "élastases". La dégradation et la fragmentation des fibres élastiques de la paroi artérielle, processus qui progresse avec l'âge et qui est très intense dans le foyer d'artériosclérose, peuvent être attribuées à la libération progressive d'élastases tissulaires. La première élastase a été isolée à partir du pancréas de porc".

Mais il a été récemment isolé par ROBERT, LEGRAND et CAEN (58) une élastase à partir des plaquettes sanguines, des polynucléaires.

En 1974, ROBERT et coll. (32 de 84) ont réussi à mettre en évidence une élastase dans les extraits salins de la paroi artérielle humaine et de plusieurs espèces animales.

HALL et TESAL, tous deux en 1971, ont montré qu'il existait deux types d'élastases appelées AEI et AES qui agissent sur des parties différentes de l'élastine : une partie contenant du calcium, l'autre étant relativement libre de cet élément (43).

ROBERT a pu écrire (84) : "L'étude détaillée de cette enzyme pourrait donner des renseignements importants concernant son rôle dans la dégradation de l'élastine au cours de l'âge et de l'artériosclérose. Tout porte à croire que c'est bien cette "élastase artérielle" qui est l'agent responsable principal de la fragmentation et de la lyse des fibres élastiques de l'aorte".

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ELASTINE (84)

A - Propriétés physiques

L'élastine a un haut degré d'extensibilité, une insolubilité marquée; elle est indestructible à la chaleur.

B - Interactions élastine-lipides

"L'élasticité de l'élastine est conditionnée par sa nature hydrophobe, ce qui explique aussi sa grande affinité pour les lipides. L'interaction élastine-lipides paraît procéder par le mécanisme "d'intercalage hydrophobe" résultant dans l'accumulation de cholestérol, de ses esters et d'autres lipides à l'intérieur des fibres élastiques. De tels complexes élastine-lipides ont été mis en évidence "in vivo" et "in vitro" et peuvent bien être responsables de la perte d'élasticité de l'élastine avec l'âge et l'artériosclérose".(84)

C - Mécanismes de l'apparition des dépôts calciques dans les artères

"L'augmentation diffuse de la teneur en calcium de l'élastine peut être expliquée par la chélation de ce métal par certaines régions peptidiques de l'élastine ainsi que par l'affinité des glycoprotéines de structure pour le calcium. Ces glycoprotéines augmentent dans les plaques et peuvent jouer un rôle en tant qu'agents de nucléation au cours de l'initiation de la formation de cristaux d'hydroxyapatite".

D - Les facteurs immuns et leurs rôles dans le développement des lésions athéroscléreuses

"La présence dans le sang circulant d'anticorps antiélastine a été signalée. La corrélation entre l'artériosclérose et ces autoanticorps a été rendue probable par l'induction de lésions athéroscléreuses par immunisation avec des extraits d'aortes (SCEBAT, RENAI, SZIGETTI)."

BEAUMONT et coll. ont mis en évidence des complexes circulants lipoprotéines-anti-lipoprotéines et une relation causale entre leur apparition et la formation des dépôts lipidiques et de xanthome a été proposée.

Après immunisation de lapins avec des protéines purifiées obtenues à partir de la paroi artérielle, ROBERT et coll. (84) montrent "que l'élastine, qui est la moins immunogène, produit par immunisation des lésions artérioscléreuses avec une très grande fréquence et régularité. Les glycoprotéines de structure, nettement plus immunogènes produisent également des lésions mais avec une fréquence plus faible".

LES GLYCOPROTEINES DE STRUCTURE

=====

La matrice intercellulaire des tissus conjonctifs est composée de protéines fibreuses telles que le collagène et l'élastine et de substance fondamentale. Elle-même contient essentiellement deux types de macromolécules : les glycoprotéines et les protéoglycanes.

DEFINITION

Les glycoprotéines sont des "hétéro-protéines résultant de l'union d'une fraction protéinique avec de courte chaîne glucidique, fixées latéralement (ou en extrémité) de la séquence polypeptidique" LOUISOT (60).

Mais à côté du collagène (qui est aussi une glycoprotéine) il faut distinguer une "glycoprotéine de structure associée avec les fibres de collagène " (ROBERT et DISCHE).

Cette dénomination permet de distinguer les glycoprotéines tissulaires des glycoprotéines sériques. Elles diffèrent, outre par leurs rôles, par leur composition, leurs propriétés immunochimiques, leur biosynthèse.

Les glycoprotéines de structure sont distinctes aussi des glycosaminoglycanes (mucopolysaccharides acides) où le carbohydrate uni aux protéines est un polysaccharide de PM élevé, avec deux sucres alternés.

COMPOSITION ET BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES DE STRUCTURE

A - Les aminoacides

Il existe une grande proportion (20%) d'acides dicarboxyliques (aspartique et glutamique), 10% d'acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine). Les glycoprotéines de structure contiennent aussi des résidus de cystine et une proportion d'acides aminés aromatiques plus élevée que celle du collagène ou de l'élastine.

On note l'absence d'hydroxyproline.

.../...

B - La copule glucidique

L'importance de la copule glucidique varie de 5 à 10% de la partie protidique selon les tissus.

On note la présence de glucose, galactose, mannose, de glucosamine, de galactosamine, de fucose et d'acide sialique dont les proportions varient en fonction des tissus.

Les chaînons glucidiques sont des hétéro-oligosaccharides ou des hétéro-polysaccharides ne présentant aucun caractère répétitif de sous-unités dissacharidiques. Leur structure est donc fondamentalement différente de celles des mucopolysaccharides.

La sialoprotéine osseuse par exemple est originale par son contenu élevé en acide sialique - et ses propriétés acides - la présence de glucosamine, de galactosamine, par sa capacité de fixer les ions et pouvant donc jouer un rôle dans la calcification.

La matrice organique osseuse est constituée pour 10% de macromolécules non collagéniques dont la majorité est constituée de glycoprotéines. Alors que dans le cartilage les glycosaminoglycanes forment la majorité des composants non collagéniques.

C - Biosynthèse

La partie protéique des glycoprotéines de structure est synthétisée selon le processus habituel de synthèse des protéines au niveau des ribosomes.

Les chaînons glucidiques d'après LOUISOT (60) sont fixés en des sites différents selon leur place définitive. Au niveau d'un site interne (polysome) est fixée l'osamine initiale, puis les glucides médians sont incorporés au niveau d'un site médian (membranes endoplasmiques), les glucides terminaux l'étant au niveau d'un site périphérique (phase cytoplasmique soluble).

Les systèmes enzymatiques des transglycosylations incorporent l'ose sous sa forme coenzymatique activée.

ROBERT (83) étudiant la biosynthèse des glycoprotéines in vitro, montre la rapidité du processus et la néo-synthèse à partir de leurs éléments constitutifs au cours de l'incubation in vitro.

PROPRIETES ET ROLE DES GLYCOPROTEINES DE STRUCTURE

Ces protéines sont faiblement solubles (elles contiennent une forte proportion d'acides aminés hydrophobes). Elles précipitent rapidement et forment spontanément des agrégats moléculaires unidimensionnels fibrillaires appelés "microfibrilles".

Pour ROBERT (82) les glycoprotéines de la membrane cellulaire (qui sont les antigènes de transplantation) ont un rôle dans la genèse des glycoprotéines de structure. Les fibres de collagène et d'élastine, au cours de leur extrusion des cellules, entraîneraient une invagination de la membrane cytoplasmique. Ainsi pourrait être expliquée la variation du rapport des glycoprotéines de structure aux autres protéines fibreuses selon le tissu. Ces invaginations constitueraient les microfibrilles.

Ces microfibrilles, selon le même auteur, fixent et orientent les unités de pro-élastine et jouent ainsi un rôle très important dans l'élastogénèse. Après la fixation, des lysines-oxydases initieraient la formation des liaisons pontiques.

La richesse des tissus en glycoprotéines de structure varient

- avec l'âge : il en existe plus dans les tissus embryonnaires et ils diminuent au cours de l'ontogénèse
- avec les tissus : le rapport quantitatif avec les autres macroprotéines de la matrice intercellulaire est caractéristique de chaque tissu et varie avec l'âge et la pathologie

Par des méthodes immunochimiques, il a pu être démontré qu'il existait une spécificité d'organe et d'espèce.

LES MUCOPOLYSACCHARIDES

=====

Nouvelle dénomination : GLYCOSAMINOGLYCANES

DEFINITION

Pour certains auteurs, les M.P.S. sont des polymères d'unités disacchariques dont un composant au moins est l'hexosamine.

Mais il existe une très grande confusion dans la définition du terme depuis 30 ans. Nous nous référerons à M. LOUISOT qui considère les M.P.S. "comme des polyosides hétérogènes résultant de la condensation d'un nombre élevé de sous-unités disaccharidiques élémentaires, constituées généralement par une molécule d'acide hexuronique unie à une molécule d'hexosamine, elle-même porteuse d'un ou plusieurs groupements sulfatés. Ils sont unis à des protéines par des liaisons électro-valentielles ou co-valentiellles. Actuellement, on utilise surtout le terme de GLYCOSAMINOGLYCANES".

Cette définition écarte certains M.P.S. "neutres", car sans acide organique ou minéral. Ils sont liés dans l'organisme à de grosses molécules de protéines et par hydrolyse, ils libèrent de l'hexoamine, des oses et de l'acide sialique. Ils sont révélés en histochimie par la coloration au P.A.S. d'HOTCHKISS-MAC-MANUS.

STRUCTURE ET CLASSIFICATION

La plupart des M.P.S. sont donc "acides", ils contiennent en effet des groupements acides disposés régulièrement sur la chaîne polysidique. Ce sont des chaînes polysaccharidiques non ramifiées constituées d'unités disaccharidiques :

- un hexosamine invariablement soit la D glucosamine
soit la D galactosamine
- un acide hexuronique sauf le kératane-sulfate qui possède à la place un résidu galactose

Ils libèrent par hydrolyse de l'hexosamine, de l'acide uronique, de l'acide sulfurique. Ils sont métachromatiques au bleu de Toluidine, colorables par le bleu alcian ou le fer colloïdal.

On distinguera les M.P.S. de structure simple ou complexe et les M.P.S. de sécrétion. Ils sont toujours unis, plus ou moins solidement, à des protéines.

La caractéristique fondamentale de ces macromolécules est leur structure primaire : répétition d'unités disaccharidiques élémentaires, ce qui conduit à la séquence alternée schématique (acide uronique - osamine).

Selon la constitution des unités disaccharidiques, on peut distinguer 6 groupes principaux de M.P.S. Pour la plupart, les liaisons glycosidiques sont du type bêta et tous les sucres aminés sont acétylés sur leur azote en position 2.

A - ACIDE HYALURONIQUE (H.A.) (LOUISOT) (60)

"C'est un polymère d'une unité disaccharidique élémentaire, l'ACIDE HYALOBUIURONIQUE résultant de la combinaison d'une molécule d'acide D-glucuronique avec une molécule de N-acétyl-D-glucosamine, réunies par une liaison glucuronosyl bêta (1 $\rightarrow$ 3).

La polymérisation du disaccharide est réalisée grâce à des liaisons bêta (1 $\rightarrow$ 4) entre une molécule de N-acétyl-D-glucosamine et l'acide D-glucuronique suivant.

Largement réparti dans les organismes, l'acide hyaluronique est présent dans toute la substance fondamentale conjonctive. L'acide hyaluronique a un poids moléculaire élevé (de l'ordre de 5 à 8 millions) pour une longueur moléculaire de 2.500 Å à 6.500 Å; c'est le M.P.S. qui présente la plus forte viscosité.

B - LA CHONDROITINE (Ch.) (LOUISOT) (60)

L'unité disaccharidique élémentaire est la CHONDROSINE, résultant de la condensation d'une molécule d'acide D-glucuronique avec une molécule de N-acétyl-D-galactosamine réunies par une liaison glucuronosyl-alpha (1 $\rightarrow$ 3) N-acétyl-D-galactosamine. La polymérisation du disaccharide est réalisée grâce à des liaisons bêta (1 $\rightarrow$ 4) entre une molécule de N-acétyl-D-galactosamine et l'acide D-glucuronique suivant.

.../...

La chondroïtine n'existe qu'en petite quantité dans la substance fondamentale conjonctive.

C - LES CHONDROÏTINES-SULFATES (LOUISOT) (60)

Leur importance biologique est capitale. Leur structure est voisine de celle des mucopolysaccharides simples que sont l'acide hyaluronique et la chondroïtine, mais ils sont en outre porteurs de groupements sulfatés diversement répartis dans la molécule, le critère de distinction étant justement la position du groupement sulfate.

L'existence de groupements acide sulfurique et acide uronique fait des chondroïtines-sulfates des polymères porteurs de très nombreuses charges négatives. Ils sont aptes à fixer très fortement les CATIONS, ce qui explique leur intérêt et leur présence dans les zones d'ossification. Les solutions de chondroïtines-sulfates sont moins visqueuses que celles d'acide hyaluronique, mais leur pouvoir de rétention d'eau demeure important.

Les chondroïtines-sulfates s'associent étroitement au collagène. Ils assument un rôle de soutien dans l'élaboration de la structure fibrillaire de ce collagène et collaborent par leur capacité à fixer les ions calcium à l'ossification. Le taux de chondroïtines-sulfates des tissus diminue d'ailleurs régulièrement avec l'âge.

a) Chondroïtine-sulfate A ou chondroïtine 4-sulfate (Ch-4-S)

Il est particulièrement abondant dans le cartilage et dans les os en voie de croissance. On l'a extrait, entre autres, de la cornée, de la peau et d'une tumeur, le chondrosarcome. Son poids moléculaire n'excède sans doute pas 50.000.

L'unité disaccharidique élémentaire est la CHONDROSINE dans laquelle un groupement sulfate estérifie la fonction alcoolique en position 4 du résidu de N-acétyl-D-galactosamine.

b) Chondroïtine-sulfate C ou chondroïtine 6-sulfate (Ch-6-S)

Il est abondant dans le cordon ombilical, les tendons, le cartilage. L'unité disaccharidique de base est la CHONDROSINE, estérifiée par un groupement sulfate en position 6 du résidu N-acétyl-D-galactosamine. Son poids moléculaire est de 40.000 pour MATHEWS.

D - LE DERMATANE-SULFATE (D.S.)

Ce mucopolysaccharide, extrait des tendons, des valvules cardiaques, de la paroi aortique et surtout de la peau, était autrefois dénommé, par erreur, chondroïtine-sulfate B. Son unité disaccharidique élémentaire résulte de la condensation d'une molécule d'acide L-iduronique (acide uronique du L-Idose) et d'une molécule de N-acétyl-galactosamine-4-sulfate, réunies par une liaison iduronosyl bêta (1 $\rightarrow$ 8) N-acétyl-D-galactosamine-4-sulfate. La polymérisation du disaccharide est réalisée grâce à des liaisons bêta (1 $\rightarrow$ 4) entre une molécule de N-acétyl-D-galactosamine-4-sulfate et l'acide iduronique suivant.

Outre cette séquence fondamentale, le dermatane-sulfate présente deux particularités intéressantes :

- l'existence de zones hybrides, où des molécules d'acide glucuronique peuvent prendre la place de l'acide iduronique dans la structure alternée
- la présence de groupements sulfates sur les résidus d'acide uronique (SUZUKI 1968) et non pas uniquement sur les galactosamines"

Le D.S. est caractérisé par sa résistance à l'action de la hyaluronidase.

D'autre part, (MAC KUSIK) (63), le D.S., in vitro, précipite le tropocollagène. La fonction principale du D.S. pourrait être la formation de fibres de collagène. La pathologie du collagène observé dans les mucopolysaccharidoses avec excrétion accrue de D.S. (M.P.S. I, II, V et VI) pourrait être due à cette propriété du D.S.

E - LE KERATANE-SULFATE (K.S.) (LOUISOT) (60)

"Il est retrouvé dans les cartilages costaux humains, les disques intervertébraux, la cornée. A l'opposé des autres mucopolysaccharides, le kératane-sulfate ne contient pas d'acide uronique et donc ne sera pas dosé par les méthodes colorimétriques de ces acides, mais du galactose et de la N-acétyl-glucosamine, porteurs de groupements sulfatés. L'unité disaccharidique fondamentale est la N-acétyl-galactosamine sulfatée".

F - M.P.S. DE SECRETION

a) Héparine mono-sulfatée

Faite d'unités de D glucosamine-N-sulfate et d'acide D-glucuronique (il existe aussi une petite fraction d'acide iduronique).

Avec l'héparine dont il serait un précurseur métabolique, il se distingue des autres M.P.S. :

- par ses propriétés anticoagulantes
- par le fait que les liaisons osidiques réunissant les sucres sont du type alpha
- par ses unités de base qui seraient non pas des "di" mais des "tetra" saccharides
- par sa résistance à l'action des chondroïtines sulfatases

b) Mucoïtines-sulfates

Ils existent dans les mucus. Leur structure est voisine de celle des chondroïtines sulfates.

PROPRIETES DE LA LIAISON OSIDIQUE

- Comme tous les glucosides, les M.P.S. sont solubles dans l'eau. En fait, les molécules étant fortement électro-négatives, cette solubilité varie largement en fonction du pH; elle est notamment beaucoup plus importante en milieu alcalin.

"	"	"
"	ACIDE HYALURONIQUE	"
"	"	Liquide synovial
"	"	Os en croissance
"	"	Ligament de la nuque
"	"	Humeur vitrée
"	"	Peau
"	"	Cordon ombilical
"	"	Aorte abdominale
"	"	Valvules cardiaques...
"	-----	-----
"	..	"
"	CHONDROITINE SULFATE A.	"
"	"	Cartilage hyalin
"	"	Os en croissance
"	"	Diaphyse osseuse
"	"	Peau
"	"	Cornée
"	"	Plasma
"	"	Aorte abdominale...
"	-----	-----
"	..	"
"	CHONDROITINE SULFATE C.	"
"	"	Cartilage hyalin
"	"	Diaphyse osseuse
"	"	Ligament de la nuque
"	"	Tendons
"	"	Cordon ombilical
"	"	Peau
"	"	Cerveau
"	-----	-----
"	DERMATANE-SULFATE	"
"	"	Peau
"	"	Tendons
"	"	Aorte
"	"	Valvules cardiaques
"	"	Parenchyme pulmonaire
"	-----	-----
"	KERATANE-SULFATE	"
"	"	Cartilage hyalin
"	"	Cartilage costal
"	"	Os en croissance
"	"	Disque intervertébral
"	"	Nucleus pulposus
"	"	Ongle
"	"	Cornée
"	-----	-----
"	HEPARINE SULFATE	"
"	"	Aorte
"	"	Utérus
"	"	Foie d'amylose...
"	-----	-----
"	HEPARINE	"
"	"	Langue
"	"	Foie
"	"	Rate
"	"	Poumons
"	"	Peau
"	"	Plasma
"	"	"

- Cette électro-négativité remarquable explique également que les M.P.S. forment avec les sels d'ammonium quaternaire des complexes insolubles (c'est sur cette propriété qu'est basée la méthode la plus employée de séparation des différents M.P.S.).

- La liaison osidique est hydrolysable.

- Elle est sensible à certaines hydrolases spécifiques. Ces enzymes sont peu nombreuses. La plupart sont libérées des lysosomes (bêta-glycuronidase, hyaluronidase, chondroïtine sulfatase).

METABOLISME DES MUCOPOLYSACCHARIDES

Ils possèdent tous une certaine inertie métabolique avec un turn-over relativement lent.

A - Biosynthèse

a) L'acide hyaluronique est synthétisé par les fibroblastes, par les cellules spécialisées du vitré (hyalocytes) et par les cellules bordantes de la membrane synoviale. JACOBSON en 1970 en a tracé les grandes étapes.

A partir du glucose, la chaîne synthétique aboutit aux sucres neutres, aux acides hexuroniques (acide glycuronique, acide iduronique) et d'autre part aux hexosamines acétylés (N-acétyl-glucosamine, N-acétyl-galactosamine) grâce à l'action de l'A.T.P. et de l'U.D.P.

L'appareil de GOLGI est le lieu de la synthèse avant l'extension dans la substance fondamentale conjonctive.

b) Les chondroïtines-sulfates (LOUISOT) (60)

* L'initiation : La biosynthèse s'effectue sur une matrice protéinique. Cette protéine est très mal connue. Il y a fixation, sur cette matrice, d'une unité de xylose sur un résidu serine, par une U.D.P.-xylose-polypeptide xylosyl-transferase.

* L'élongation commence par la fixation de deux résidus galactosyl sur le premier ose. Ce n'est qu'ensuite que commence la véritable synthèse du mucopolysaccharide par adjonction successive des unités acide glucuronique et N-acétyl-galactosamine. Ces unités sont préalablement activées en U.D.P.-ose et fixées par des transglycosylases

Toutes ces transférases sont strictement spécifiques de leur substrat. Ainsi s'explique la formation de la chaîne où alternent acide hexuronique et hexosamine.

* La sulfatation s'effectue par un mécanisme mal connu. Le sulfate provient de sa forme activée, le P.A.P.S. (3'-phospho-adenosine-5'-phospho-sulfate). La fixation des sulfates peut survenir en même temps que la polymérisation, ou plus tard, au moment de la libération des chaînes d'unités disaccharidiques.

c) Le dermatane-sulfate a une biosynthèse mal connue. Elle se fait dans les fibroblastes.

d) L'héparine est sécrétée par les mastocytes.

D'une façon générale, la parathormone, la vitamine A, la vitamine C augmentent la synthèse des M.P.S. alors que la pression et les corticoïdes la diminuent. Le vieillissement diminue la synthèse, sauf celle du kératane-sulfate.

Le contrôle hormonal du métabolisme des protéoglycanes est particulièrement important et correspond aux actions métaboliques, protéiques et glucidiques des hormones.

Par exemple, le déficit en insuline entraîne une diminution de la biosynthèse des protéoglycanes, raison essentielle à l'augmentation de la susceptibilité aux infections des diabétiques, de leur lente cicatrisation, de leur tendance à l'athérosclérose et de leurs troubles vasculaires.

B - Catabolisme des protéoglycanes

Leur dégradation comporte à la fois celle de la copule protéique et celle de la copule polysaccharidique.

. Les enzymes protéolytiques sont largement réparties dans tous les tissus et entraînent la libération de glycosaminoglycanes acides dans le sang puis dans les urines.

.../...

. Les enzymes de dégradation de la copule polysaccharidique sont contenues essentiellement dans les lysosomes du milieu. On classe les saccharidases en

- endopolysaccharidases :

- . Hyaluronidases (testiculaire, des spermatozoïdes, des autres tissus lysosomiales, bactériennes)
- . Enzymes de dégradation des autres polysaccharides, chondroïtine sulfatase, héparinase... (tissulaires, bactériennes)

-exopolysaccharidases : bêta-glucosaminidase, bêta-glucuronidase, hexosaminidases

1 - LA DEGRADATION TISSULAIRE

. L'acide hyaluronique subit l'action d'une hyaluronidase. Cette enzyme se trouve dans plusieurs espèces de bactéries et dans les testicules de mammifères. Son action se fait en trois étapes :

- dépolymérisation
- section de la molécule au milieu de la chaîne en oligo-saccharides
- et enfin, libération des constituants : acétyl-glucosamines et acides glycuroniques

La hyaluronidase a donc un rôle en tant que facteur de diffusion, d'où ses actions thérapeutiques.

La dégradation de l'acide hyaluronique peut être aussi obtenue in vitro par les radiations ionisantes, l'acide ascorbique.

. La dégradation des acides chondroïtine-sulfuriques 4 et 6 et de la chondroïtine simple se fait :

- par l'action des hyaluronidases produisant de l'N-acétyl-chondrosine
- . - par des chondromucases spécifiques libérant de l'acétyl-chondrosine

.../...

. L'héparine est dégradée par une héparinase spécifique.

. Au total, la dégradation enzymatique des M.P.S. aboutit à la libération d'oligosaccharides, de disaccharides et de leurs constituants : acétyl-hexosamines et acides uroniques.

Ces produits peuvent être à nouveau métabolisés ou rejetés dans l'organisme.

a) Les oligosaccharides subissent soit une transglycolysation, soit une hydrolyse (par des bêta-glycuronidases ou des bêta-hexosaminidases). On ne connaît pas la destinée exacte de ces produits (synthèse de nouveaux M.P.S., mais aussi élimination dans les urines).

b) Les acétylhexasamines sont réintégrés dans le métabolisme glucidique par désacétylation, désamination, phosphorylation. Ces acétylhexasamines libres ne seraient donc jamais retrouvés dans les urines.

c) Les acides uroniques peuvent subir trois destinées :

- Être conjugués pour former des esters uroniques que l'on peut retrouver dans les urines (c'est un processus de détoxication normal de l'organisme)
- Être réduits pour former de l'acide ascorbique et du glucose
- Être oxydés par les acides di et tricarboxyliques du cycle de KREBS

EN CONCLUSION

La majeure partie des catabolites est réintégrée dans le métabolisme glucidique. Dans les urines, nous retrouverons donc, à la fois des oligosaccharides et des glycuronides.

2 - ETAPE SANGUINE DE LA DEGRADATION DES M.P.S.

De nombreux travaux ont permis de déceler des mucoprotéines sériques.

D'autre part, on a pu isoler des M.P.S. leucocytaires (216 de 33) et plaquettaires. Par ailleurs, les parois artérielles contiennent elles-mêmes des M.P.S.

Depuis ces dernières années, une meilleure connaissance de leur métabolisme à ce niveau permet d'étudier la physiopathologie de l'athérosclérose (83) (48).

3 - ETAPE RENALE DE L'ELIMINATION DES M.P.S.

Les mécanismes de cette étape laissent encore de nombreuses inconnues.

Le passage des M.P.S. dans les urines semble bien se faire par un mécanisme de filtration glomérulaire après un phénomène de dépolymérisation.

Après les travaux de MARCELET en 1967 (259 de 33), on peut admettre des mécanismes d'échange au niveau du rein et une filtration accrue dans certaines néphropathies.

Cependant, l'excrétion urinaire des M.P.S. ou de leurs produits de dégradation est très faible et ne reflète qu'imparfaitement les variations du métabolisme des M.P.S. de l'organisme.

En effet, bien que le turn over quotidien apparent des M.P.S. semble se calculer en grammes, le taux plasmatique est inférieur à un mg par litre et l'excrétion urinaire quotidienne de quelques mg seulement (3 à 15 mg/24 heures) (114, 115, 49 de 33) (RIMDIN D.L. TORRANCE Calif. Communication personnelle 1972 : 442 a de MAC KUSIK (63) .

Pour H. MUIR, les réactions de dosage, et notamment les réactions de précipitations au cétyl-pyridinium-chloride de DI FERRANTE et RICH sur laquelle nous reviendrons, seraient donc très incomplètes.

Mais, inversement, à de faibles variations des M.P.S. urinaires, doivent donc correspondre des désordres métaboliques intenses.

.../...

Nous devons enfin signaler que les produits rejetés dans les urines peuvent être chimiquement différents de leurs états initiaux dans les tissus et qu'il peut y avoir de grandes variations quantitatives et qualitatives des M.P.S. urinaires selon le tissu métabolisé et son activité.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES GLYCOSAMINOGLYCANES

A - ROLE HYDROMINERAL ET STRUCTURAL

Les chaînes mucopolysaccharidiques réalisent des poly-électrolytes polyanioniques et fixent les cations, essentiellement du Na^+ , mais aussi du K^+ , du Mg^+ . Mais la nature et la concentration des électrolytes peuvent modifier la structure de la molécule polyanionique et modifier ainsi son volume. De même, par leur charge, les M.P.S. produisent dans leur solution une certaine pression osmotique qui peut entraîner l'eau liée aux molécules.

En ce qui concerne l'acide hyaluronique, dont le rôle semble particulièrement important dans ce phénomène d'hydrophilie, elle retient l'eau dans les espaces interfibrillaires; la diminution de son taux, dans les tissus élastiques et certains rhumatismes, s'accompagne d'une baisse de l'élasticité alors que son augmentation s'associe à une infiltration, voire un oedème tissulaire.

La présence de ces grosses molécules au sein de la substance fondamentale permettrait de régler les échanges qui s'y font et notamment de contrôler la diffusion des protéines.

D'autre part, les M.P.S. maintiennent la rigidité tissulaire.

B - ROLE DANS LA CALCIFICATION

L'ossification comporte deux phénomènes simultanés à l'état normal :

- formation d'une substance pré-osseuse ostéoïde
- minéralisation de cette substance

La substance ostéoïde est formée de fibres de collagène et de substance fondamentale interfibrillaire dans laquelle le sulfate de chondroïtine joue un rôle important pour l'ossification.

Le rôle des M.P.S. semble être de permettre l'initiation de la minéralisation physiologique ou pathologique.

C - PROPRIETES ANTIGENIQUES

Le complexe mucoprotidique a des propriétés antigéniques. Elles permettent de former des immuns sérums anticartilage, et par conséquent d'envisager une étiopathogénie particulière aux arthropathies.

D - Enfin, les M.P.S. ont un rôle nutritionnel, de protection et de lubrification des articulations.

MODIFICATION DU METABOLISME DES GLYCOSAMINOGLYCANES DU CARTILAGE

A - SELON L'AGE

Dans le cartilage vieillissant, il existe une baisse du rapport hexosamine/collagène traduisant une diminution de la quantité de substance fondamentale du cartilage.

Par ailleurs, le degré de polymérisation des M.P.S. de cartilage d'âges différents paraît varier, la fraction lourde augmentant aux dépens de la fraction légère.

Au niveau du cartilage costal, le KS absent à la naissance s'accroît jusqu'à 30 ans, plafonne et à 80 ans forme 50% de la substance fondamentale du fait de la baisse des autres polysaccharides. MATHEWS.

Dans le cartilage articulaire, différemment, le KS ne se rencontre qu'à partir de 40 ans.

On a aussi décrit des variations de la composition des M.P.S. selon l'âge dans le nucleus pulposus, la peau et la paroi aortique.

Le vieillissement articulaire normal semble donc être dû à un déséquilibre entre le catabolisme tissulaire normal et une synthèse qui paraît diminuée.

B - SUIVANT L'ACTIVITE FONCTIONNELLE ET LA REGENERATION

Les articulations les plus mobilisées ont une teneur en chondroïtine-sulfate supérieure aux autres (272 de 33).

De même, le fibrocartilage qui contient moins de M.P.S. se retrouve dans les zones de moindre fonction, alors que le cartilage hyalin se trouve dans des articulations plus mobiles ou supportant plus de poids.

C - DANS L'ARTHROSE

HIRSCH en 1944 avait déjà montré une baisse du taux de chondroïtine-sulfate dans la chondromalacie de la rotule allant de pair avec une diminution de l'élasticité. Le rapport M.P.S. (mesuré en hexosamines) sur collagène (mesuré en hydroxyproline) diminue (274 de 33).

Les polysaccharides du cartilage arthrosique sont dépolymérisés favorisant leur dispersion et cela jouerait un rôle principal dans la susceptibilité du cartilage à l'érosion des zones physiquement traumatisées.

Mais alors que la diminution du taux des M.P.S. dans le cartilage vieillissant semble due à une moindre activité chondrocytaire, dans l'arthrose celle-ci est nettement exagérée par un processus réactionnel à la destruction anormale de la substance fondamentale.

D - DANS LA P.C.E. ET LES ARTHRITES PURULENTES

La destruction cartilagineuse, consécutive à un rongement par le pannus synovial, résulte d'un trouble extra-cellulaire (du collagène et du complexe mucoprotidique).

Ces lésions ont fait suggérer de même l'intervention de phénomènes enzymatiques.

En découvrant la nature et l'origine de ces enzymes, on pourrait envisager un contrôle possible des lésions.

ETUDE DES PHENOMENES INDUCTEURS DES LESIONS DEGENERATIVES OU ARTHRITIQUES

L'intervention des phénomènes mécaniques de surmenage et d'usure articulaire semblent être évidents dans de nombreuses arthroses spontanées.

Mais interviennent aussi des phénomènes chimiques et enzymatiques.

1 - L'action de la papaïne a été révélée par l'expérience classique de THOMAS sur les oreilles de lapin dont elle produit l'affaïssement. Elle entraîne en effet une dégradation des complexes protidopolysaccharidiques. La même action se manifeste sur les M.P.S. du cartilage articulaire et trachéal qui passent dans le sang et sont excrétés par les urines. WEISSMAN et coll. 1959.

2 - La plasmine interviendrait dans les processus ostéo-articulaires. Elle provoque après injection IV, le même effet que la papaïne sur les oreilles du lapin.

Le plasminogène inactif du plasma par la transudation inflammatoire se répand dans des espaces interstitiels et notamment le liquide synovial où elle est activée par les kinases (leucocytaire, bactérienne et en particulier les streptokinases). L'acide epsilon-amino-caproïque, inhibiteur de la plasmine, peut dans une certaine mesure contrarier ce phénomène.

3 - La vitamine A a la même action à forte dose en IV sur les oreilles du lapin.

Pour DINGLE et coll. (121 de 33) la vitamine A fragiliserait la paroi des lysosomes et ainsi la libération des enzymes protéolytiques.

De nombreuses autres constatations prouvent l'importance des lysosomes dans la pathogénie des affections rhumatologiques.

Les lysosomes sont des particules cellulaires cytoplasmiques isolées en 1955 par DE DUVE et renfermant la presque totalité des hydrolases acides cellulaires.

Les activités enzymatiques lysosomiales sont nombreuses. On décrit notamment :

- . des bêta galactosidases
- . des hyaluronidases
- . des sulfatases

.../...

Quatre enzymes lysosomiales sont essentielles à la dégradation :

- alpha L iduronidase
- Héparan sulfate sulfatase
- N-acétyl-alpha-D-glucosaminidase
- bêta glucuronidase

Le rôle de ces enzymes en rhumatologie semble de plus en plus évident dans deux phénomènes fondamentaux :

- comme facteur d'entretien et d'aggravation de l'inflammation rhumatismale par des phénomènes immunologiques (189 de 33)
- comme facteur de destruction de la substance fondamentale dans les processus dégénératifs comme l'arthrose ou au cours de synovite chronique par l'intermédiaire du pannus synovial

Ainsi, tous les mécanismes favorisant la libération d'enzymes lysosomiales favoriseraient la dégradation du cartilage. Nous avons vu que la vitamine A, à doses non physiologiques, a cette propriété, à l'inverse des corticoïdes qui stabilisent la membrane lysosomiale.

Ce mécanisme est à la base de théories pathogéniques des atteintes articulaires (438 - 440 - 442 - 304 de 33), mais les expériences pratiquées dans ce sens semblent aboutir plutôt à des lésions de type arthritique qu'arthrosiques (exception faite cependant pour l'injection intra-articulaire de filiprine par WEISSMAN et coll.) (441 de 33).

"	Stabilisent les lysosomes	"	Fragilisent les lysosomes	"
"		"		"
"	Glucocorticoïdes	"	. Ions Ca^{++} et Mg^{++}	"
"	Antimalariques de synthèse	"	. Toxines bactériennes	"
"	Salicylés	"	(endotoxines, streptolysines O et S	"
"	Sels d'or	"		"
"	Antihistaminiques	"	. Antibiotiques polyènes	"
"	Cholestérol	"	(filipine, étruscomycine	"
"		"	piramicine, amphotéricine)	"
"		"	. Virus	"
"		"	. Carbures cancérigènes	"
"		"	. Rayonnements électromagnétiques	"
"		"	Rayons X et Rayons UV	"
"		"	. D.O.C.A.	"
"		"	. Progestérone	"
"		"	. Vitamine A, Vitamine D	"
"		"	. Sels biliaires	"
"		"	. Protéases (papaïne, trypsine	"
"		"	streptokinases)	"
"		"	. Hypoxie	"
"		"	. Hyperoxie	"
"		"	. Acidité	"
"		"	. Anticorps antilysosomes	"
"		"		"

D'après FREZET (33)

DEUXIEME PARTIE

=====

A - ETUDE DU METABOLISME DU COLLAGENE

EXPLORATION DU METABOLISME DU COLLAGENE IN VITRO

=====

La plupart des techniques d'étude du métabolisme du collagène sont utilisées seulement dans les laboratoires de recherche. C'est le cas pour l'exploration in vitro. Nous ne ferons donc que citer celles que nous avons pu trouver au cours de notre travail que nous avons volontairement limité dans ce sens.

Les différentes méthodes utilisent des fragments de tissus prélevés sur des animaux ou des ponctions biopsies prélevées sur l'homme.

A - DETECTION DES DEFICITS ENZYMATIQUES PAR LA CULTURE DE FIBROBLASTES ET DE CELLULES AMNIOTIQUES

Ces techniques permettent de détecter actuellement une soixantaine de maladies métaboliques par enzymopathies.

Le fibroblaste a beaucoup de potentialités métaboliques et il est capable de synthétiser du collagène, de l'élastine, des M.P.S. mais aussi d'autres systèmes enzymatiques. C'est pourquoi il est utilisé dans l'étude des erreurs héréditaires du métabolisme comme un substitut habituel aux biopsies de foie ou d'autres organes moins accessibles.

B - ETUDE QUANTITATIVE DE LA SYNTHÈSE DU COLLAGÈNE (FREY) (38)

L'incubation de tissus ou de fibroblastes avec de la proline marquée par du ^{14}C permet d'apprécier la quantité du collagène synthétisé en dosant l'hydroxyproline marquée. On peut aussi par cette technique étudier le rapport collagène synthétisé sur protéine non collagénique synthétisée en étudiant le rapport hydroxyproline marquée sur proline marquée.

On peut également calculer l'indice de sécrétion du collagène en étudiant le rapport hydroxyproline marquée du milieu sur hydroxyproline marquée totale.

C - ETUDE DE L'APTITUDE D'UN TISSU A SYNTHETISER DU COLLAGENE SOLUBLE ET INSOLUBLE (FREY) (38)

L'étude de prélèvements tissulaires de lapin montre qu'il existe des différences quantitatives et qualitatives dans le métabolisme du collagène en fonction des tissus étudiés. Ainsi, le tissu cutané contient plus de collagène insoluble que le tissu aortique qui en contient lui-même plus que le tissu hépatique; ces différences provenant essentiellement de l'activité métabolique propre à chaque tissu.

D - ETUDES DYNAMIQUES DE L'INFLUENCE DE CERTAINS FACTEURS

Il existe des techniques permettant d'apprécier l'influence de certains facteurs comme les flavonoïdes qui, sans action chez le sujet normal, entraînent une réduction de l'hypersolubilité rencontrée au cours de certains syndromes pathologiques (exemple : Ehlers-Danlos type V et flavonoïdes (DI FERRANTE) .

E - AUTRES TECHNIQUES

D'autres radiotraceurs sont utilisés pour l'étude du métabolisme du collagène en pathologie humaine :

- Lysine marquée à ^3H qui permet, par exemple, de suggérer l'existence d'une perturbation de la régulation de la biosynthèse et/ou de la dégradation de macromolécules de la matrice intercellulaire dans le diabète (MOSCAR) (70).

- Proline marquée à ^3H et glucosamine ^{14}C qui permettent, par exemple, d'étudier les anomalies ultrastructurales des membranes basales des capillaires conjonctivaux chez les diabétiques. En effet, au niveau de biopsies conjonctivales humaines incubées en présence de ces précurseurs radioactifs, KERN 1976 (53) note l'altération du métabolisme de la matrice extracellulaire, notamment au niveau du collagène, mais aussi au niveau des glycoprotéines de structure, des glycosaminoglycanes. Ces perturbations semblent préexister dans la descendance non malade de diabétiques (KERN).

- Glucosamine marquée avec ^3H et proline ^{14}C . REGNAULT a étudié l'incorporation de ces radiotraceurs dans les biopsies de conjonctives pratiquées chez le diabétique. Il montre qu'il existe une déviation métabolique résultant dans une exagération de la synthèse du collagène et des glycoprotéines de structure pouvant expliquer les épaissements des membranes basales des capillaires rétinien et autres.

Ainsi, ces techniques d'incorporation de radiotraceurs dans des cultures cellulaires faites à partir de biopsie de la conjonctive permettraient la détection précoce du diabète.

*

* *

.../...

EXPLORATION DU METABOLISME DU COLLAGENE IN VIVO

=====

Les principales étapes du métabolisme du collagène sont actuellement bien définies. Son étude porte d'une part sur certains acides aminés plus ou moins spécifiques, d'autre part sur certaines enzymes de synthèse. Toutes ces études, exceptée celle de l'hydroxyprolinurie, sont réservées actuellement aux laboratoires de recherche. Nous étudierons successivement :

- La proline-hydroxylase
- La lysyl-hydroxylase
- La lysyl-oxydase
- La proline imino-peptidase
- puis - La proline urinaire
- L'hydroxylysine
- et surtout - L'hydroxyproline

PROLINE HYDROXYLASE

A - STRUCTURE ET ACTION

Cette enzyme agit sur les résidus de proline présents dans des enchaînements polypeptidiques du procollagène, avec une étroite spécificité pour les séquences du type Y-X-Pro-gly dans lesquelles X doit être leu, pro, ala ou glu et Y, gly, arg ou lys. Elle nécessite la présence d'oxygène, de fer, d'alphacétoglutarate et d'ascorbate.

Sa synthèse passe par le stade d'un précurseur qui doit être activé.

L'affinité de l'enzyme pour le procollagène est très élevée.

L'enzyme a été purifiée par KIVIRIKKO, obtenue cristallisée, visualisée au microscope électronique; elle est constituée par des monomères, dimères ou tétramères. Chaque monomère a la forme d'un anneau de 40 Å de diamètre, de masse moléculaire 110.000. Elle possède des groupements thiol libres indispensables à son activité. Sa masse moléculaire étant inférieure à celle du procollagène sur lequel elle agit, VIELLARD (101) pense qu'elle se déplace le long du filament.

Elle est inhibée par le cortisol (95) et le calcium (32). Elle serait au contraire, au moins dans la peau de rat nouveau-né, activée par la sérum-albumine et par l'acide lactique (95).

D'autre part, l'affinité de la procollagène-proline hydroxylase augmente avec la longueur de la chaîne polypeptidique du substrat (117).

B - TECHNIQUE D'ETUDE

L'activité de la proline hydroxylase a été déterminée dans de nombreux tissus (peau, muscle, foie, poumon) et dans le sang.

Les méthodes de dosage sont basées essentiellement sur celle de HUTTON et Coll. (47) (STEIN et coll. : 8 de 69) et utilisent la mesure de l'eau tritiée quand la proline tritiée présente dans le collagène est hydroxylée en hydroxyproline.

.../...

C - VARIATIONS PATHOLOGIQUES

A notre connaissance il n'a pas été décrit de mutations génétiques portant sur la proline-hydroxylase (forme léthale?) contrairement à l'absence génétiquement déterminée de lysine-hydroxylase.

Comme le souligne VIELLARD (101), il est difficile d'affirmer que les anomalies biochimiques décrites dans des syndromes très variés ont une réelle part dans le développement de la maladie et ne sont pas au contraire ses conséquences. Les modifications de l'activité de la proline-hydroxylase permettent parfois cependant une interprétation physiopathologique.

1 - Au niveau des tissus

a) Augmentation

Ainsi, l'augmentation de l'activité de la proline-hydroxylase cutanée dans les sclérodermies est peut-être "la raison pour laquelle le renouvellement du collagène est accéléré chez ces malades et le pool de collagène neutro-soluble augmenté par rapport au collagène insoluble" (95).

De même, on a signalé l'augmentation d'activité de la proline-hydroxylase cutanée chez les malades atteints de Pseudoxanthoma elasticum.

Au niveau de la synoviale d'articulations pathologiques de patients atteints de P.C.E., l'activité de la proline-hydroxylase est augmentée. UITTO et coll. (2 de 1) mettant cette augmentation en parallèle avec celle de la proportion d'hydroxyproline dans la fraction non dialysable de ces tissus, suggèrent qu'il y a une augmentation de la biosynthèse dans la synoviale de P.C.E. Mais à ce sujet, HARRIS (3 de 1) note une augmentation de la dégradation du collagène dans la synoviale de P.C.E. Ainsi, KIVIRIKKO (4 de 1) explique l'augmentation de l'hydroxyproline dans ces maladies en combinant ces deux résultats.

Au cours de l'athérosclérose, il y a une élévation de son activité, en particulier mesurée dans la paroi aortique chez le lapin (FULLER) (39).

.../...

Après infarctus du myocarde expérimental par l'isoprotérénol chez le rat, JUDD et WEXLER (49) montrent que l'activité de la proline-hydroxylase myocardique augmente légèrement 24 heures après, très nettement du 2ème au 4ème jour pour redescendre du 5ème au 18ème jour.

Dans l'intoxication alcoolique chronique, surtout au niveau du foie, il y a aussi une augmentation de son activité (FEINMAN) (27 B). La plus haute activité de la proline-hydroxylase est trouvée dans la cirrhose; le taux d'activité de l'enzyme est moyen chez les patients ayant une infiltration graisseuse hépatique (MEZEY) (69).

"L'activité de la proline-hydroxylase paraît accrue dans tout tissu conjonctif en voie de synthèse active comme le granulome inflammatoire ou les tissus embryonnaires.

Il est curieux de constater qu'elle est aussi accrue au cours de la carence en vitamine C" (MUSSINI) (73).

b) Diminution d'activité de l'enzyme

Les cas sont plus rares. Ils pourraient être liés à la chélation du fer, indispensable à son activité. MARKS et SHUSTER (64) rapprochent les états d'hyposidérémie chronique de certains troubles cutanés qui pourraient résulter de l'inhibition de la proline-hydroxylase.

2 - L'activité de la proline-hydroxylase dans le sang a été très étudiée par STEIN, KEISER-SJOERDSMA (91).

Il ne semble pas y avoir de corrélation du taux enzymatique avec l'âge, ni de variation avec le nycthémère.

L'élévation de l'activité sérique de la proline-hydroxylase est ainsi notée chez des malades ayant une affection hépatique.

Les taux les plus élevés sont notés en cas d'hépatome. L'augmentation est nette aussi dans les cas de néoplasme avec métastases hépatiques, de rétention biliaire, d'hépatite, de cirrhose. Il existe alors une excellente corrélation entre l'activité de la proline-hydroxylase et le taux de phosphatase alcaline.

Par contre, en cas d'atteinte osseuse : Paget, métastase osseuse, tumeur osseuse primitive, il n'y a pas d'augmentation. De même, le taux est normal dans les cas de sclérodermie, P.C.E., LED, syndrome de Sjorgen, syndrome de Marfan.

Ainsi, contrairement à ce qui est noté au niveau tissulaire, l'augmentation de l'activité de la proline-hydroxylase dans le sang semble être le reflet de l'altération des fonctions hépatiques plus que celui de la synthèse du collagène.

LA LYSYL HYDROXYLASE

L'hydroxylation de la lysine en hydroxylysine est catalysée par la lysyl hydroxylase. Cette enzyme, comme la prolylhydroxylase, nécessite la présence d'oxygène, de fer, d'alphacétoglutarate et d'ascorbate comme cofacteurs et cosubstrats.

Cette enzyme, comme la prolylhydroxylase, hydrolyse les résidus lysyl seulement en position Y dans la séquence X-Y-Gly.

Bien que l'hydroxylation des résidus lysyl du collagène soit initiée alors que les polypeptides sont encore assemblés sur les ribosomes, il semble que la formation d'hydroxylysine continue après le détachement des polypeptides ribosomes (UITTO) (96).

L'hydroxylation des résidus lysine est variable selon le type de collagène. Les types I et III contiennent moins d'hydroxylysine que le type II. La plus importante hydroxylation de résidus lysine se fait au niveau du collagène type IV.

Dans la peau de l'homme, l'activité de la lysyl hydroxylase est la plus haute chez le fœtus, reste plus haute chez l'enfant que chez l'adulte. Les variations de la proline hydroxylase sont parallèles (ANTTINEN) (6).

Les hydroxylations des résidus lysine et proline se font à la même vitesse.

En pathologie humaine, il a été décrit un déficit en lysylhydroxylase dont la traduction est le syndrome d'Ehlers-Danlos type VI (150). L'activité enzymatique étudiée à partir de culture de fibroblastes cutanés est alors de 10% de celle des contrôles. Ceci a conduit à proposer comme thérapeutique la prescription de fortes doses de vitamine C, cofacteur de cette enzyme comme nous l'avons vu. Par ailleurs, les pontages dérivant de l'hydroxylysine étant chimiquement plus stables que ceux dérivés de la lysine, l'absence d'hydroxylysine explique l'instabilité du collagène de ces malades.

.../...

LA LYSYL OXYDASE

De nombreuses propriétés uniques des tissus conjonctifs, comme la résistance à la traction et la basse solubilité de leurs protéines constitutives, sont dues à la formation de pontage au niveau des molécules de collagène et d'élastine.

La réaction initiale de la constitution de ces pontages est la formation d'epsilon-aldéhydes, appelées allysine et hydroxyallysine, de certains résidus lysyl et hydroxylysyl. La formation d'aldéhydes est catalysée par une enzyme : la lysyloxydase.

Nous avons vu que cette enzyme nécessitait la présence de cuivre, de phosphate de pyridoxal. Elle a une forte affinité pour le collagène natif, mais il existerait une inhibition dans le métabolisme du collagène in vivo, de mécanisme inconnu (cf. 9 de 46 A).

Le dosage de l'activité enzymatique au niveau tissulaire peut se pratiquer. Les techniques utilisent du tritium (46 A) (HAYAKAWA). Au niveau de la peau, il n'y a pas de modification de l'activité avec l'âge, le sexe.

MODIFICATION DE L'ACTIVITE DE L'ENZYME

L'actinomycine D déprime de 10% l'activation par le cuivre de l'enzyme. Le zinc, la carence en vitamine B₆, la pénicillamine, les lathyrogènes inhibent également l'enzyme.

En pathologie humaine, on peut retrouver des modifications d'activité.

Ainsi, dans la maladie de Marfan, l'enzyme est inhibée ce qui explique la ressemblance avec le lathyrisme expérimental (BAILEY) (10)

Il existe une absence de cette enzyme dans la maladie d'Ehlers-Danlos type V (DI FERRANTE et coll.) (23), dans une forme de cutis-laxa (UITTO) (96), dans le syndrome de Menkes où le défaut d'absorption intestinale du cuivre réduit l'activité de la lysyloxydase (UITTO) (96).

LA PROLINE IMINO-PEPTIDASE =====

La dégradation du collagène est initiée, nous l'avons déjà vu, par des collagénases et peut-être par d'autres protéases. Les peptides qui en résultent, qui contiennent de l'hydroxyproline, sont plus tard dégradés par plusieurs enzymes et parmi celles-ci : la proline imino-peptidase. Cette enzyme est présente dans le sang.

L'étude de la dégradation du collagène, en pratique médicale courante, est basée actuellement sur le dosage de l'hydroxyprolinurie. Nous essaierons, dans une autre partie, de souligner son intérêt, en dégageant les difficultés de son interprétation : sa dépendance avec l'âge, l'alimentation, la part des processus de synthèse et de dégradation. D'autre part, nous avons mentionné l'étude de REID (81) soulignant qu'une partie appréciable d'hydroxyproline est présente dans la fraction C 1 q du complément.

La proline imino-peptidase, de dosage relativement aisé, peut donner une mesure de la dégradation du collagène.

La méthode de dosage est basée sur celle de GRIES et coll. (8 de 106) et se fait grâce à des substrats synthétiques.

La valeur moyenne est de 4,7 mU/l (S.D. 0,9).

Il n'y a pas de modification ni avec l'âge, ni avec le sexe, ni avec l'alimentation et son dosage ne demande qu'un prélèvement sanguin, ce qui est incontestablement d'un grand intérêt.

WHITELEY et coll. dans leur étude (106) sur cette enzyme, montrent son taux normal dans les affections hépatiques avec augmentation des phosphatases alcalines, par contre le parallélisme de son augmentation, dans la maladie de Paget, avec l'accroissement des taux de phosphatases alcalines et d'hydroxyprolinurie, sa décroissance par le traitement avec le diphosphonate.

L'augmentation du taux sérique dans la maladie de Paget est due certainement selon les auteurs à une hyperactivité des cellules osseuses plus qu'à un effet secondaire de la dégradation du collagène.

L'étude de cette enzyme semble donc particulièrement intéressante pour une analyse plus précise de la dégradation du collagène.

PROLINE URINAIRE

La proline n'étant pas spécifique des protéines fibreuses du tissu conjonctif, l'étude isolée de son élimination urinaire ne peut donner d'indication précise sur le métabolisme de ces protéines. C'est pourquoi cette étude est souvent couplée à celle de l'hydroxyprolinurie.

NUSGENS et LAPIERE (76) déterminent l'hydroxyproline (technique de PROCHOP et UDENFRIEND) et la proline (technique de TROLL et LINDSLEY) sur le produit d'hydrolyse chlorhydrique d'un aliquot d'une diurèse de 24 heures récoltée sous toluol.

En l'absence de protéinurie pathologique, les urines contiennent en quantités constantes des peptides renfermant de la proline et pas d'hydroxyproline; ils proviennent du catabolisme de toutes les protéines. Dans le collagène, le rapport molaire est environ de 1,2. Le rapport de ces deux acides aminés dans les urines se rapprochera d'autant plus de l'unité que les catabolites du collagène y seront abondants. Ce rapport prolinurie/hydroxyprolinurie sera parfois utile dans l'interprétation des valeurs aberrantes résultant d'une mesure inadéquate du volume de la diurèse.

A - PENDANT LA CROISSANCE

Hydroxyproline, proline et rapport entre les deux dans les urines peuvent être utilisés comme des indices de croissance.

L'élimination urinaire de la proline subit des variations analogues à celles de l'hydroxyproline, mais non semblables.

Le rapport proline/hydroxyproline, situé aux environs de $1,2 \pm 0,15$ chez l'enfant de 1 à 8 ans, augmente progressivement pour atteindre $2,3 \pm 0,5$ chez l'adulte où il demeure constant. Il est semblable chez l'homme et la femme (76 A).

B - EN PATHOLOGIE

L'excrétion urinaire de proline varie dans les troubles du métabolisme du collagène, de même que l'hydroxyproline. Mais le rapport proline/hydroxyproline est abaissé. On peut interpréter ces variations comme des modifications dans la proportion des peptides urinaires dues aux polypeptides du collagène et ceux qui ne proviennent pas du collagène.

HYDROXYLYSINE =====

Le collagène est la seule protéine qui contient de l'hydroxylysine en quantité appréciable. Il en contient moins qu'il ne contient d'hydroxyproline. Pour 100 g de collagène (de peau de boeuf par exemple) on trouve 1 g d'hydroxylysine et 13 g d'hydroxyproline.

La teneur en hydroxylysine varie avec l'origine et l'état physiologique des tissus.

L'hydroxylysine ne peut être directement incorporée dans le polypeptide du collagène mais doit être formée par la lysine qui est hydroxylée.

Tout comme l'hydroxyproline, l'hydroxylysine est un indicatif utile du métabolisme du collagène. L'avantage de la mesure de l'hydroxylysine tient au fait que cet acide aminé suit les mêmes variations que l'hydroxyproline mais, n'étant pas influencée par un régime sans collagène, sa détermination est particulièrement utile chez des sujets soumis à un régime normal.

DOSAGE DE L'HYDROXYLYSINE

La détermination de l'hydroxylysine se fait le plus fréquemment, comme pour l'hydroxyproline, par colorimétrie qui mesure les chromophores produits à partir de l'oxydation chimique des acides hydroxyaminés.

L'analyse des acides aminés et notamment celle de l'hydroxylysine peut être effectuée par chromatographie gazeuse. L'hydroxylysine donne régulièrement deux sommets qui correspondent aux isomères DL et DL-ALLO. L'emploi d'un étalon interne d'acide 2,4-diaminobutyrique facilite la précision de la mesure quantitative. Cette analyse se fait après conversion des acides aminés en leurs dérivatifs ester-N-heptafluorobutyryl-N-propyl puis séparation sur colonne Densil 300 GC à 15% (123).

L'HYDROXYLYSINE DANS LE COLLAGENE

Rappelons que c'est au niveau de certains résidus hydroxysyle des chaînes alpha que des transglycosydases fixent les groupements galactosyle et glucosyl-galactosyle.

Les pontages intermoléculaires impliquent la participation des résidus lysyle et hydroxylysyle auparavant transformés par désamination oxydative.

Il y a une compétition entre la glycosylation des résidus hydroxylysyle et leur participation à des ponts interchaînes.

GLYCOSIDES DE L'HYDROXYLYSINE

Sur l'hydroxylysine totale mesurée dans les urines, 80% ($27,7 \pm 1,0$ micromoles) sont associés aux sucres dans deux composés glycosidiques : glucosyl-galactosyl-hydroxylysine et galactosyl-hydroxylysine.

La proportion de ces glycosides d'hydroxylysyle est variable suivant les tissus.

Il y a 1,6 fois plus de glu-gal-hyl que de gal-hyl dans le collagène de la peau, tandis qu'il y a sept fois plus de gal-hyl que de glu-gal-hyl dans le collagène osseux. On a suggéré que les deux glycosides d'hydroxylysyle proviennent directement du collagène et que leur taux dans les urines reflète les proportions dans le type de collagène dégradé préférentiellement.

Il est à remarquer que le glucosyl-galactosyl-hydroxylysine et le galactosyl-hydroxylysine sont deux substances présentes uniquement dans les collagènes mais aussi dans les membranes basales. Cependant, l'étude de l'excrétion des glucosides de l'hydroxylysine reste intéressante car ASKENASI et coll. (7 A) ont montré que le parenchyme rénal n'intervient pas plus que pour 10% dans cette excrétion. Les sources rénales de ces substances sont non seulement la membrane basale glomérulaire mais aussi la M.B. tubulaire et le collagène interstitiel présent dans le rein.

Cependant, une autre source possible des glucosides de l'hydroxylysine urinaire est le sous-composé C 1q du complément humain. Le contenu en hydroxylysine de cette protéine est virtuellement identique à celui de la membrane basale glomérulaire (CALCOTT, MULLER, EBERME) (17). Cependant, le C 1q représente seulement 0,3% des protéines présentes dans le sérum. Son apport dans les urines est donc probablement très faible, mais reste cependant à préciser.

Les sujets normaux éliminent davantage de glu-gal-hyl que de gal-hyl ($16,2 \pm 0,5$ et $11,5 \pm 0,5$ micromoles par gramme de créatinine). Le rapport des deux substances est toujours supérieur à 1.

Chez tous les malades souffrant de maladies osseuses ou de la peau, il y a une augmentation de l'élimination d'hydroxylysine.

En cas de maladie osseuse, l'augmentation de gal-hyl est plus grande que celle de gly-gal-hyl. Il s'ensuit un rapport gly-gal-hyl/gal-hyl légèrement inférieur à 1.

En cas de maladie de la peau, l'augmentation de glu-gal-hyl est plus forte, le plus souvent, que celle de gal-hyl d'où un rapport glu-gal-hyl/gal-hyl supérieur au rapport des sujets normaux.

A la différence de l'hydroxyproline, les glycosides d'hydroxylysine montreraient l'origine de la dégradation du collagène (139).

L'HYDROXYPROLINE

I - INTRODUCTION

Acide aminé non indispensable, isolé par FISCHER en 1902, l'hydroxyproline n'est apparemment présente dans aucune autre protéine que le collagène (excepté l'élastine qui en contient une quantité minime). Le dosage de l'hydroxyproline urinaire, qui se retrouve dans presque toute sa totalité sous forme combinée dans les urines, se fait habituellement sur des urines de 24 heures. L'intérêt du dosage de l'hydroxyproline réside dans le fait qu'elle est le reflet certain du métabolisme du collagène.

La difficulté provient de ce qu'une variation de l'hydroxyproline urinaire représente apparemment tout autant une variation de la synthèse qu'une dégradation du collagène.

Diverses affections en pathologie, notamment osseuse, provoquent des modifications du taux de l'hydroxyproline urinaire.

Il faut souligner une étude récente importante. REID (81) a mis en évidence qu'une partie appréciable d'hydroxyproline est présente dans la fraction C 1q du complément. En conséquence, le dosage de l'hydroxyproline sérique est maintenant définitivement abandonné.

II - STRUCTURE CHIMIQUE ET METABOLISME

A - STRUCTURE

Tout comme son homologue, la proline, l'hydroxyproline (dont la seule source est l'hydroxylation, in situ, de proline) n'est pas un véritable acide aminé, mais plutôt un alpha-aminoacide cyclique, dérivé de la pyrrolidine.

La L-Hydroxy-4-proline représente la presque totalité des formes naturelles de l'hydroxyproline.

Elle est très soluble dans l'eau et a un poids moléculaire de 131,14.

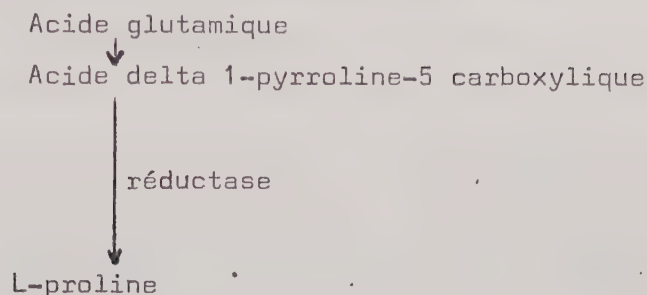
.../...

B - METABOLISME

1 - Formation

Elle comprend deux étapes :

. Biosynthèse de la proline



. Hydroxylation de la L-proline

Cette conversion est liée à la biosynthèse du collagène.

Des expériences, à l'aide de proline marquée avec du ^{15}N (STETTEN) (135) et du deutérium révèlent qu'en trois jours un quart de l'hydroxyproline de l'organisme se renouvelle aux dépens de la proline ingérée. Le collagène est marqué sur la proline et sur l'hydroxyproline. Par contre, si on administre de l'hydroxyproline marquée, celle-ci n'est pas retrouvée au niveau du collagène. L'hydroxyproline libre ne représente pas la source naturelle de l'hydroxyproline du collagène.

Il existe donc une relation étroite entre l'hydroxylation de la proline et la biosynthèse du collagène.

L'hydroxylation de la proline survient lorsque celle-ci est incorporée dans la molécule de protocollagène et ne se fait que lorsque le polypeptide complet est libéré du ribosome.

2 - Catabolisme

L'hydroxyproline suit la voie métabolique des autres constituants du collagène. On la retrouve :

a) Sous forme libre

Une faible partie est éliminée directement dans les urines, une autre est catabolisée au niveau du foie et au niveau du rein pour donner :

- la delta-pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylique (HPC)

- l'acide gamma-ceto-glutarique (HGK)
- puis l'acide glyoxylique dégradé en CO_2 et l'acide pyruvique qui rejoint le cycle de Krebs

b) Sous forme liée

La majeure partie de l'hydroxyproline est liée à un ou deux peptides. Après la filtration glomérulaire 90 à 95% de ces di et tri-peptides sont réabsorbés.

Bien qu'apparemment les voies de la biosynthèse et de la dégradation présentent des parties communes, il semble qu'elles soient en réalité séparées, les synthèses enzymatiques ayant lieu dans des régions différentes de la cellule.

III - PHYSIOLOGIE DE L'HYDROXYPROLINE

L'hydroxyproline est un acide aminé glucoformateur non indispensable que l'on retrouve essentiellement dans le poisson, la viande, la gélatine. Son taux dans les urines est fonction du régime alimentaire. Il faudra donc un contrôle diététique au cours du dosage (25).

La concentration en acides aminés du filtrat glomérulaire est identique à celle du plasma. Ils sont presque entièrement réabsorbés au niveau du tube proximal surtout lors du jeûne.

L'hydroxyproline libre, qui est presque entièrement réabsorbée par le tubule rénal (environ 99%) mais qui contrairement à la majorité des acides aminés n'est pas utilisable pour la synthèse protéique, aboutit à la formation d'urée, de CO_2 et de NH_3 .

Par contre, les hypropeptides sont éliminés dans les urines à un taux de 25 mg par jour environ.

L'hydroxyproline urinaire comprend ainsi 1 à 3% d'hydroxyproline libre et plus de 95% d'hydroxyproline liée à un peptide (14 peptides différents) le plus abondant étant la prolyl-hydroxyproline (60%). Mais pour PROCKOP, 5 à 10% seulement de l'hydroxyproline provenant de la dégradation du collagène se retrouvent dans l'urine sous forme d'hypropeptides ou d'hydroxyproline libre.

L'os entrerait pour une part prépondérante dans l'origine de cette hydroxyproline urinaire.

A - VARIATIONS NYCTHEMERALES

Il existe un rythme circadien d'élimination urinaire de l'hydroxyproline totale. Les études faites par MAUTALEN (108) et S. RADOM, M. ZULAWSKI et E. DAHLIG (109) montrent qu'il existe chez les sujets normaux des variations journalières avec un maximum au cours de la nuit (2 h. - 8 h.) et un minimum dans la journée (12 h. - 20 h.).

B - VARIATIONS SPONTANÉES A COURT TERME

L'évolution d'un jour à l'autre chez un même sujet révèle de grandes variations quant aux résultats des dosages de l'hydroxyproline urinaire ($35 \pm 30\%$) (EISINGER) (27 A).

Deux moyens pour pallier de telles variations seraient :

- . de doser sur la moyenne des urines de deux jours
- . de rapporter l'hydroxyproline de 24 heures à la créatinine de 24 heures

En effet, WILLIAM et WINDSOR (124) montrent qu'il n'existe pas, ainsi, de grandes variations d'un jour à l'autre.

EISINGER montre que la comparaison de ces deux moyens ne fait pas apparaître de différences significatives.

Cependant, BERNARD (13) estime que le dosage de l'hydroxyproline de 24 heures, même rapportée à la créatinine, présente des variations de près d'un tiers, mais que cette variation s'atténue de façon significative sur 48 heures, et encore mieux, l'hydroxyproline de 48 heures rapportée à la créatinine.

.../...

C - VARIATIONS SUIVANT L'AGE

Les travaux de JASIN et coll. (111) ont permis de montrer qu'il existait un taux d'hydroxyproline urinaire plus élevé chez le sujet jeune (2 à 3 fois) que chez l'adulte. Cette différence est d'autant plus grande qu'on est en période de croissance active, et apparaît nettement si on rapporte le taux d'hydroxyproline au mètre carré de surface corporelle ou à la créatininurie.

ALLISON précise qu'il existe une augmentation de 0 à 1 mois (correspondant à l'hyperaminoacidurie du premier mois et à une augmentation du turn over du collagène) puis une diminution de 6 mois à 5 ans suivie d'une période sans variation jusqu'à 10 ans. Il est à noter que chez le nouveau-né on observe un rapport hydroxyproline libre/hydroxyproline totale plus important que chez l'adulte (jusqu'à 45% contre 3 à 5%).

Pour SALEH (110) il existe une augmentation de l'hydroxyproline urinaire jusqu'à 16 ans puis une diminution entre 17 et 24 ans. L'élévation est maximale en période de croissance rapide. Puis une période constante lui fait suite jusqu'à 70 ans.

NUSGENS (76 A) observe que l'excrétion quotidienne d'hydroxyproline augmente de la première enfance (1-4 ans), à la puberté (8-12 ans), reste élevée pendant la puberté (12-20 ans) et décroît chez les adultes.

Ces taux élevés au cours des périodes de croissance active permettent de dire qu'il existe une corrélation étroite entre la croissance et l'excrétion d'hydroxyproline et que ceci est dû à la présence d'une quantité accrue de collagène soluble métaboliquement actif.

Chez le vieillard, le taux diminue ce qui ne semble pas être dû à des modifications de la cléarence rénale, ni de la transformation de l'hydroxyproline en urée. Il existe des modifications du collagène comme le montre une diminution des pools d'hydroxyproline (LINDSTEDT) à demi-vie courte et la diminution des échanges osseux (explication au Ca^{45}).

.../...

Une hydroxyproline urinaire qui saura être considérée comme normale chez l'adulte jeune parce qu'aux alentours de 40 mg/24 h. devra être prise en considération chez le vieillard. La limite supérieure du taux d'hydroxyproline urinaire chez le sujet âgé est en effet de 35 mg/24 h.

D - VARIATIONS SUIVANT LE SEXE

L'hydroxyproline urinaire semble plus élevée chez l'homme que chez la femme (112 - 114) :

- hommes (33 mg/24 h.)
- femmes (27 mg/24 h.)

Cependant, rapportées à la surface corporelle ou à la créatinine urinaire, les valeurs chez les hommes et chez les femmes sont sensiblement voisines.

Pendant la grossesse, le taux s'élève dans les deux derniers mois, passant en moyenne de 25 à 50 mg/24 h., pour chuter rapidement après la naissance. Cependant, il existe pendant la grossesse une hyperaminoacidurie généralisée (114 - 115 - 116 - 117 - 118).

E - VARIATIONS AVEC LE REGIME, LE JEÛNE

1 - Le régime

L'hydroxyproline urinaire pour PROCKOP n'est pas modifiée en cas de diète prolongée en hydroxyproline et en gélatine. Mais un régime riche en collagène augmente l'hydroxyproline libre et liée du sang et des urines, mais pour que l'augmentation soit nette il faut ajouter au moins 20 à 30 g de gélatine au régime.

Cependant, chez l'enfant mal nourri, WHITEHEAD montre qu'il existe une chute du rapport hydroxyproline/créatinine (125).

Chez le jeune enfant, il existe une relation entre la quantité de liquide apporté et l'élimination d'acides aminés (126). Chez l'adulte, par contre, il n'y a pas de variation de l'hydroxyproline urinaire en cas de déshydratation ou de surcharge hydrique.

2 - Le jeûne

Au cours du jeûne, en tant que traitement de l'obésité, l'élimination urinaire d'hydroxyproline s'accroît lorsque la durée de jeûne strict se prolonge; par contre, elle diminue quand la réalimentation hypocalorique est entreprise (BALL).

BOLET (127) démontre que le collagène de la peau et des os peut devenir un réservoir de protéines en période de jeûne.

L'hydroxyproline reflète le catabolisme du collagène en vue de la néoglycogénèse à partir des réserves extracellulaires riches en collagène. Les sujets jeunes vont, en période de jeûne, éliminer davantage d'hydroxyproline que les sujets âgés, ceci parce que le collagène est d'autant plus lié que le sujet est plus âgé.

IV - LES HYPROPEPTIDES URINAIRES

Le collagène est dégradé par une collagénase spécifique dont l'activité se limite à quelques liens peptidiques spécifiques. La protéolyse libère ensuite des acides aminés libres et des peptides courts. Ces peptides semblent échapper à une protéolyse complète et une proportion constante est excrétée dans les urines. L'hydroxyproline urinaire comprend, nous l'avons déjà noté, 1 à 3% d'hydroxyproline libre et plus de 95% d'hydroxyproline liée à un peptide.

A - COMPOSITION DES HYPROPEPTIDES

La majorité des peptides à l'hydroxyproline sont des peptides à bas poids moléculaire.

90 à 95% de ces hypropeptides, dont 14 ont été à présent isolés, sont représentés par 3 peptides (122 - 128 - 129) :

- prolyl-hydroxyproline qui représente 60% des peptides excrétés
- acide glutamique-hydroxyproline-acide glutamique (15%)
- glycine-proline-hydroxyproline (15%)

A côté de ces peptides à bas poids moléculaire, 5 à 10% d'hypropeptides de plus grande taille, non dialysables, ont été mis en évidence.

V - SIGNIFICATION DE L'HYDROXYPROLINE PAR RAPPORT AU COLLAGÈNE

L'excrétion urinaire de l'hydroxyproline est utilisée comme un test pour évaluer le métabolisme du collagène, constituant du tissu conjonctif. Le collagène contient presque toute l'hydroxyproline du corps. L'élastine n'en contient que 2%.

A - SOURCE DE L'HYDROXYPROLINE URINAIRE

Au cours de régimes alimentaires excluant tout apport protéinique, l'hydroxyproline ne descend pas au-dessous d'un taux limite. La seule source des peptides à l'hydroxyproline est alors le collagène ou ses précurseurs.

Il n'existe pas d'augmentation du taux des hypropeptides urinaires après administration d'hydroxyproline libre, ce qui ne provoque qu'une augmentation de l'excrétion de la forme libre.

Une source négligeable proviendrait de la synthèse à partir de l'acide glyoxylique et de l'acide pyrurique.

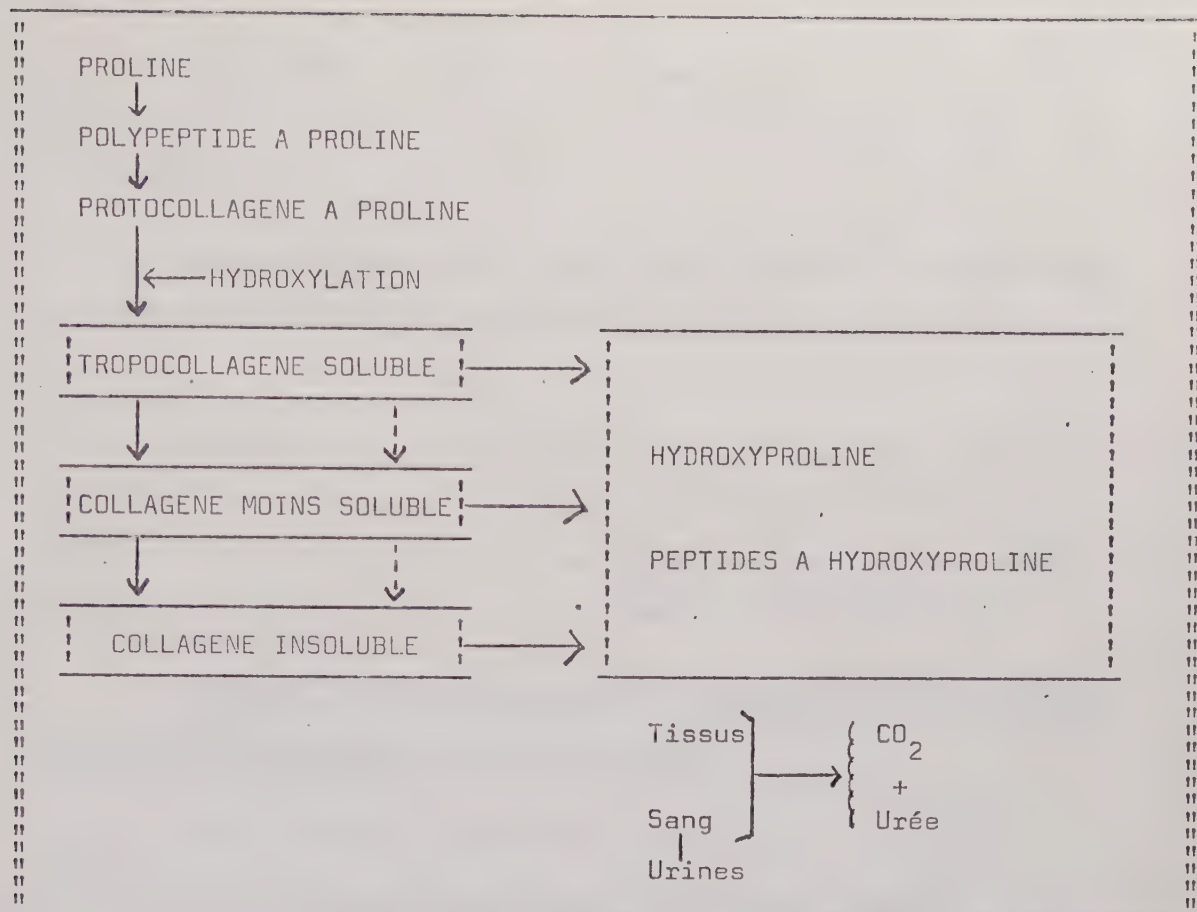
L'hydroxyproline (comme l'hydroxylysine) ne peut être directement incorporée dans le polypeptide de collagène mais doit être fournie par la proline (ou la lysine) qui est hydroxylée.

Pour 90%, l'hydroxyproline provient du collagène osseux et représente donc un paramètre du métabolisme et de la croissance osseuse.

Cependant, l'hydroxyproline urinaire ne se limite pas au problème du métabolisme osseux, mais semble refléter l'ensemble du métabolisme du collagène de l'organisme.

L'hydroxyproline incorporée à la molécule de collagène va suivre la voie métabolique des autres constituants de cette protéine. Le reflet de ce métabolisme au niveau des tissus, du sang, des urines, est la libération continue de collagènes solubles, collagènes moins solubles, dégradés partiellement, de peptides à hydroxyproline, d'hydroxyproline libre (57 B).

.../...



D'après LAURENT (57 B)

B - QUE REPRESENTÉ L'HYDROXYPROLINE URINAIRE ?

Le collagène soluble dont les liaisons sont les plus rudimentaires est le collagène le plus facilement extractible.

Des études isotopiques ont montré que l'hydroxyproline et les hydropeptides excrétés dans les urines proviennent en grande partie de la dégradation du collagène soluble. Mais ces métabolites reflètent aussi la synthèse du collagène, par dégradation prématurée du collagène en voie de synthèse comme le suggèrent les fractions à turn over rapide et les études chez l'enfant où il existe une excrétion élevée de peptides à hydroxyproline.

L'apparition dans le sérum de l'hydroxyproline protéinique est contemporaine de la synthèse des différentes formes solubles du collagène comme le prouve l'injection de proline marquée (38).

Le collagène soluble représente au maximum 1% du collagène total. Mais son taux de renouvellement est comparable à celui des protéines sériques ou hépatiques. Dans les processus anaboliques mais aussi cataboliques, il y a une formation accrue de collagène soluble.

Le collagène mature qui représente 80% chez le jeune, 98% chez l'adulte, participe aussi à la libération de métabolites à hydroxyproline.

PROCKOP a calculé que chez le rat, 2/3 de l'hydroxyproline urinaire proviendraient du collagène insoluble, 1/3 du collagène soluble.

L'étude du taux d'hydroxyproline urinaire en fonction de l'âge, dans le post-partum (involution utérine), au cours du jeûne strict chez l'adulte jeune et le sujet âgé, montre une corrélation entre cette élimination et le taux tissulaire de collagène soluble.

EN SOMME, L'HYDROXYPROLINE PROVIENDRAIT DONC DE PROCESSUS DE SYNTHÈSE ET DE DÉGRADATION DU COLLAGÈNE.

Une hyperhydroxyprolinurie a donc lieu :

- soit par augmentation du collagène soluble
- soit par augmentation de la synthèse du collagène
- soit par augmentation de la dégradation du collagène insoluble

Elle reflète donc l'importance du turn-over du collagène de l'organisme. Il semblerait nécessaire, pour entraîner une variation du taux, qu'il se produise des modifications métaboliques importantes.

COMMENT DISTINGUER LES VARIATIONS DUES À UNE MODIFICATION DE LA SYNTHÈSE DE CELLES DUES À UNE MODIFICATION DE LA DÉGRADATION ?

C'est l'intérêt du dosage comparé de l'hydroxyproline avec d'autres paramètres.

COURVOISIER et ZENDER (19 A) étudiant l'hydroxyproline avec d'autres paramètres osseux habituels observent que :

- calciurie et hydroxyproline sont indépendantes de l'urée
- la diminution de l'hydroxyproline et de la calciurie résulte d'une diminution du turn-over osseux

- dans les ostéopathies où s'effectue un remaniement, il existe une augmentation de l'hydroxyproline urinaire, remaniement dû soit à une résorption de collagène mature, soit à la formation de collagène nouveau (soluble)

- en cas d'élévation de l'hydroxyproline par résorption osseuse (résorption du collagène mature) il existe une corrélation positive entre la calciurie et l'hydroxyproline urinaire

- en cas d'élévation de l'hydroxyproline par formation de collagène nouveau, une corrélation positive existe entre les phosphatases alcalines plasmatiques et l'hydroxyproline urinaire (métastases osseuses, maladie de Paget)

EISINGER (26 C) au cours d'une étude portant sur la maladie de Paget montre que les relations entre l'hydroxyproline urinaire et le turn-over calcique sont significatives, qu'elles le sont moins entre hydroxyproline et fond calcique commun, et qu'il existe une certaine corrélation entre l'hydroxyproline urinaire et la résorption ostéoclastique. Par contre, il n'existe pas de corrélation entre la résorption périostéocytaire et l'hydroxyproline urinaire et les corrélations entre hydroxyproline et phosphatases alcalines ne sont que discrètement significatives.

MEUNIER (68), étudiant biopsie osseuse, hydroxyprolinurie au cours de la maladie de Paget, trouve également une corrélation avec le taux urinaire d'hydroxyproline et estime qu'il est possible de suivre l'efficacité thérapeutique par l'étude de l'hydroxyprolinurie.

VI - DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE

PRECAUTIONS

Le dosage de l'hydroxyproline pour lequel plusieurs méthodes ont été proposées nécessite certaines précautions dans l'alimentation d'une part, dans le prélèvement d'autre part.

1 - Précautions alimentaires

Nous l'avons vu, l'influence du régime alimentaire sur le taux d'excrétion urinaire de l'hydroxyproline est certaine. Un régime pauvre en collagène entraînera une diminution de l'hydroxyproline urinaire ainsi qu'une atténuation de ses variations journalières.

Des 85% de l'hydroxyproline restante, absorbée par l'intestin au cours du régime excluant viande, poisson et gélatine, 30% le sont sous forme libre (forme qui est métabolisée), moins de 10% sous forme liée qui sont éliminés dans les urines. Cela représente environ 8% de l'hydroxyproline ingérée, ce qui est insignifiant en regard du taux des hypropeptides d'origine endogène.

ZIFF propose un régime contenant moins de 100 mg d'hydroxyproline.

KOCHER propose un régime contenant une quantité fixe de calcium permettant le dosage simultané de l'hydroxyproline et du calcium urinaire, régime débutant 24 heures avant la récolte des urines.

Ce régime comprend 1500 calories environ

- 150 mg de calcium
- 700 mg de phosphore
- 50 mg de protéine
- 2 g de collagène (250 mg HP)

De ce régime, il faut exclure : le lait, la bière, les vins et eaux minérales, le fromage, les extraits de viande, la charcuterie, tous les produits pouvant contenir de la gélatine.

.../...

2 - Précautions dans le prélèvement des urines

Les urines seront récoltées soigneusement sur des périodes que nous allons étudier.

Le flacon collecteur sera dans la mesure du possible entreposé au frais (+ 4°) pendant toute la période de prélèvement sinon et de toute façon, les urines seront conservées sous toluène ou merseptyl.

Un échantillon de 50 cc est ensuite prélevé, tout en ayant pris soin de rendre auparavant le milieu homogène, et mis au congélateur (- 20°) jusqu'au moment du dosage.

TECHNIQUES DE DOSAGE

1 - Principe

L'hydroxyproline apparaît dans l'organisme sous différentes formes : libre, incluse dans des peptides ou liée à des protéines.

La méthode d'analyse de l'hydroxyproline repose sur un certain nombre d'étapes successives que l'on retrouve en totalité ou en partie dans les différentes techniques proposées (plus de 60).

Ces étapes sont les suivantes :

- l'isolement : on isole, soit l'hydroxyproline dans un hydrolysât protéique ou peptidique, soit les peptides qui contiennent l'hydroxyproline. L'isolement de l'hydroxyproline est effectué la plupart du temps sur une colonne de résine échangeuse d'ions. La séparation des peptides fait appel à la chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

- l'hydrolyse : l'hydrolyse va libérer les différents acides aminés. Celle-ci se fait habituellement en milieu acide concentré. Par exemple pour l'urine : hydrolyse en tube scellé, par l'acide chlorhydrique à 120° pendant 3 heures, prolongée pendant 24 heures s'il s'agit d'un homogénéisat tissulaire ou de protéines.

- dosage spécifique de l'hydroxyproline : il met en jeu des réactions d'oxydation sélective ce qui conduit à la formation de dérivés pyrroliques

On opère avec des oxydants doux. L'hydroxyproline seule est touchée. La proline reste inattaquée.

Deux types d'oxydants sont proposés :

- des peroxydes
- la chloramine

Cette oxydation conduit à la formation de l'acide pyrroline-hydroxy-4-carboxylique-2 puis de pyrrole. Ces deux constituants semblent se retrouver en un mélange de proportions à peu près équivalentes.

Les différents procédés visant à extraire soit les dérivés pyrroliques, soit les chromogènes gênants qui troublent la caractérisation des dérivés pyrroliques par leur coloration voisine paraissent pouvoir être négligés pour la détermination concernant la biologie clinique.

- réactions d'identification et de dosage des dérivés pyrroliques : les dérivés pyrroliques ainsi formés sont alors dosés par diverses réactions, le plus souvent colorimétriques. Il y a formation d'un complexe coloré avec la paradiméthylamino-benzaldehyde (réactif d'EHRlich).

2 - Autres techniques de dosage

La méthode exposée ci-dessus est celle utilisée le plus fréquemment. Cependant, il existe d'autres techniques :

- dilution isotopique (KEISER et Coll.) (52 B)
- radioactivité (113 - 119 - 120)
- enzymologie par un système enzymatique issu de *pseudomonas* (121)

3 - Méthodes de dosage

a) Méthode de PROCKOP et UDENFRIEND

En 1960, PROCKOP et UDENFRIEND proposent une méthode (136) qui sera améliorée en 1961 par WDESSNER (137), méthode simple et précise.

Sa technique reprend les principes que nous venons d'exposer, c'est-à-dire :

- une hydrolyse à 124° pendant 3 heures
- une oxydation ménagée par la chloramine T
- une décarboxylation obtenue au bain-marie à 100°C
- une extraction du pyrrole obtenue dans le toluène
- une coloration avec le réactif d'EHRlich et rapport de la densité optique à la courbe d'étalonnage

b) Dosage de l'hydroxyproline par le test hypronosticon
(41 B - 41 C)

Il s'agit d'une méthode nouvelle et simplifiée de mesure de la concentration urinaire d'hydroxyproline.

- Principe de GOVERBE
 - Fixation des acides aminés et peptides sur résine
 - Elimination des composés gênants par lavage
 - Hydrolyse des peptides en contact avec résine (16 heures à 100°)
 - Elution des acides aminés par augmentation du pH
 - Réaction colorée quantitative et photométrique

Le principe consiste en l'utilisation comme l'un des réactifs essentiels d'une résine échangeuse de cations forts du type polystyrène sulfoné. Ceci permet l'isolement et l'analyse des acides aminés et des peptides. Les acides aminés et les peptides sont ionisés en milieu acide et les cations formés peuvent être fixés sur ces résines et séparés par élution avec des tampons de pH et de force ionique croissante.

Cette méthode permet de catalyser l'hydrolyse acide des liaisons peptidiques à forte température.

Il y a ensuite oxydation et coloration.

.../...

- Réactifs utilisés

- granulé d'Amberlite, CG 120 type II, de module 200-400, qui est une résine mise sous forme acide, lavée jusqu'à réaction neutre, et séchée. Il est présenté sous forme de comprimés
- solution étalon d'hydroxyproline, solution aqueuse d'hydroxyproline libre de concentration 50 mg/ml.
- solution oxydante, 1.375 mg de chloramine T pur dans 100 ml de 2-propanolol à 30,8% contenant un tampon citrate (0,10 M)-acétate (0,35 M)-pH 6
- réactif coloré : 24 g de para-diméthylamino-benzal-déhyde dissous dans 36 ml d'acide perchlorique à 60-62% et complétés à 330 ml avec de l'isopropanol
- tubes à hydrolyse : tubes de verre borosilicaté (16 x 100 mm) à bouchon à vis, portant deux traits de jauge à 2,5 et 10 ml
- autres réactifs : solution 2 N d'hydroxyde de sodium dans de l'eau distillée,

H Cl 2N

Isopropanol

Solution à 1% de phénolphtaléine

Tous les réactifs sont présentés en une trousse.

- Conduite de dosage

Pour le dosage en double d'un échantillon d'urine, on prend 5 tubes à hydrolyse qui sont étiquetés : U_1 et U_2 (urine), S_1 et S_2 (urine + étalon), B (blanc).

On ajoute un comprimé de résine dans chaque tube.

Dans tous les tubes, sauf B, on met 0,5 ml d'urine.

Dans les tubes S_1 et S_2 , on ajoute 10 ml de solution-étalon d'hydroxyproline.

.../...

Les tubes sont ensuite agités puis centrifugés. Le liquide surnageant est décanté et les tubes fermés.

On procède à l'hydrolyse en chauffant les tubes à 100° pendant 16 heures.

Après refroidissement des tubes, on ajoute une goutte de phénolphthaléine et on neutralise la résine par la solution 2N d'hydroxyde de sodium jusqu'à virage de coloration stable.

On ajoute de l'eau distillée pour aboutir à un volume de 2,5 ml. Après centrifugation, on prélève 0,5 ml du liquide surnageant que l'on met dans un tube à essai. On rajoute une goutte d'H Cl 2N pour décolorer l'indicateur.

On laisse les tubes pendant quatre minutes à la température ambiante, après avoir ajouté 1 ml de propanol et 0,5 ml de solution oxydante.

On ajoute 10 ml de réactif coloré et, après agitation, on chauffe les tubes à 60° pendant 25 minutes. Les tubes sont ensuite refroidis à l'eau courante, puis déposés pendant 30 minutes.

L'absorption des solutions U_1 , U_2 , S_1 et S_2 est mesurée à 560 nm par rapport au Blanc (E_{U_1} , E_{U_2} , E_{S_1} , E_{S_2}).

Les résultats sont calculés ainsi :

$$C_1 = \frac{2 \times E_{U_1} \times 50}{E_{S_1} - E_{U_1}} \qquad C_2 = \frac{2 \times E_{U_2} \times 50}{E_{S_2} - E_{U_2}}$$

La précision obtenue est de 3,5% après familiarisation avec la méthode.

La spécificité de la méthode a été étudiée par addition d'un grand nombre de substances qui étaient indiquées comme perturbant le dosage de l'hydroxyproline. Aucun effet notable n'a été observé.

.../...

L'inconvénient réside dans le fait qu'elle ne permet pas le dosage de l'hydroxyproline libre, et donc de savoir si le régime sans hydroxyproline est bien suivi.

c) Méthode de l'autoanalyseur Technicon

Elle permet le dosage de 60 échantillons à l'heure, ce qui, compte tenu du fait que l'on intercale un godet d'eau entre chaque prélèvement d'urine, permet 30 dosages à l'heure.

SUR QUELLES URINES PRATIQUER LE DOSAGE ?

1 - Urines de 24 heures .

Classiquement, le dosage de l'hydroxyproline s'effectue sur les urines de 24 heures, de 8 heures à 8 heures, ce qui élimine de ce fait les variations journalières et paraît donc être la méthode la plus satisfaisante.

Néanmoins, cette méthode a contre elle le fait qu'il existe des variations spontanées de l'hydroxyproline urinaire d'un jour à l'autre (27 A) (13).

Par ailleurs, le taux normal sur 24 heures de l'hydroxyproline varie suivant la technique utilisée et selon les auteurs.

Cependant, on peut considérer que le taux moyen de l'hydroxyproline totale est de 30 à 40 mg par 24 heures chez le sujet adulte normal (PROCKOP et Coll., SJOERDSMA), 30 mg en moyenne entre 20 et 50 ans, et 25 mg entre 50 et 70 ans.

Chez l'enfant, nous avons vu que les taux sont plus élevés que chez l'adulte. Il est cependant difficile de donner un tableau des valeurs normales chez l'enfant sans tenir compte de l'âge, du milieu social, de l'état nutritionnel.

Chez le vieillard de plus de 70 ans, la moyenne est de 20 mg/24 heures (110 - 117).

.../...

Dosage rapporté au mètre carré de surface corporelle : Proposée par ANDERSON et LAITINEN, cette méthode est peu utilisée chez l'adulte. Par contre, elle est intéressante chez l'enfant où les résultats de l'hydroxyproline urinaire rapportée à la surface corporelle sont particulièrement démonstratifs. Les différences entre les taux d'hydroxyproline/24 heures et les taux d'hydroxyproline/m/24 heures sont maximales chez le nouveau-né et l'adolescent.

Les chiffres sont élevés au cours des périodes de croissance maximale.

2 - Urines de 48 heures

Il est souhaitable que le dosage de l'hydroxyproline porte sur les échantillons d'urines de 2 fois 24 heures, et même 3 fois 24 heures, ceci parce que des variations spontanées peuvent se produire d'un jour à l'autre.

Une étude statistique (27 A) portant sur 30 sujets montre des variations considérables d'un jour à l'autre chez un même sujet.

Cependant, ce dosage effectué sur deux ou trois jours ne permet que difficilement de savoir dans quelle mesure le recueil des urines a été correct. Elle ne permet que la comparaison des diurèses qui ne doivent pas varier considérablement d'un jour à l'autre pour un même sujet.

Par ailleurs, il n'est pas non plus toujours facile d'éliminer du régime du malade certains aliments riches en collagène.

Cette façon de procéder a toutefois la préférence de certains auteurs (27 A - 13) de par sa plus grande précision. En effet, les variations de l'hydroxyproline de 48 heures et de l'hydroxyproline de 48 heures rapportée à la créatinine sont moindres que celles portant sur 24 heures.

Les variations trouvées par BERNARD (13) sont :

- pour la moyenne de l'hydroxyproline de 2 jours :
 $27 \pm 19\%$

- pour la moyenne de l'hydroxyproline de 2 jours rapportée à la créatinine : $23 \pm 14\%$

3 - Echantillon d'urine pris au hasard dans la journée

Cette méthode est criticable du fait même des variations journalières que l'on observe dans l'élimination de l'hydroxyproline.

Cependant, certains auteurs (125 - 138), se servant du rapport Hydroxyproline/Créatininurie, l'utilisent volontiers pour apprécier l'état nutritionnel et pour avoir une indication sur le taux de croissance chez l'enfant, en prenant toutefois la précaution de recueillir les échantillons toujours à la même heure. (HAWELLS) (138). L'avantage réside dans le fait qu'il est alors très facile de recueillir les urines, notamment à domicile.

4 - Urines du matin

a) Premières urines du matin

KULKARNI remarque que le rapport hydroxyproline/créatininurie des urines émises en premier le matin se compare favorablement avec le rapport de celles recueillies sur 24 heures. L'avantage tient au fait qu'il existe une position allongée, une activité limitée, et que l'échantillon d'urine recueilli représente une période d'activité métabolique plus longue que n'importe quel autre échantillon pendant la période de 24 heures (69 de 13).

Par ailleurs, le prélèvement est facile, d'autant plus que les travaux de HOWELLS et WHITEHEAD précisent qu'il n'existe aucun changement dans l'hydroxyproline des spécimens d'urines qui sont acidifiées et gardées une semaine à la température ambiante.

En effet, toujours d'après KULKARNI, la comparaison des rapports hydroxyproline/créatininurie d'urines émises les premières avec celles de 24 heures montra un éventail allant de 77 à 127%, avec une variation moyenne de 103%.

Par contre, pour des échantillons d'urines prises au hasard, la variation moyenne du rapport hydroxyproline/créatininurie le plus faible au plus élevé, pour un même individu, fut de 187%, avec un éventail de 124 à 381%.

La variation des rapports hydroxyproline/créatininurie des spécimens individuels comparés aux spécimens communs sur 24 heures alla de 37% à 159%.

b) Urines sur 3 heures (de 6 heures à 9 heures)

Une étude effectuée par RADOM porta sur l'excrétion urinaire de l'hydroxyproline aux périodes suivantes : 6 h - 9 h, 9 h - 15 h, 15 h - 18 h, 18 h - 6 h.

Les résultats pour tout le groupe, rapportés à la surface corporelle, pendant ces périodes de temps définies, furent :

6 h - 9 h	663 $\pm$ 125
9 h - 15 h	525 $\pm$ 162
15 h - 18 h	544 $\pm$ 153
18 h - 6 h	608 $\pm$ 137

Ces résultats montrent une quantité d'hydroxyproline plus importante pour les urines de 6 heures à 9 heures par rapport aux autres périodes, mais c'est au cours de cette période que le coefficient de variabilité semble être le plus bas.

Par ailleurs, chez les sujets présentant des tumeurs osseuses, le rythme circadien semble conservé. Le taux d'élimination de 6 heures à 9 heures reste pratiquement toujours le plus élevé. Pour cette raison, il semble possible d'accroître la sensibilité du dosage de l'hydroxyproline dans le diagnostic de laboratoire des tumeurs osseuses.

Si chez des patients le choix du prélèvement se porte sur les urines prises au hasard, il faut prendre soin de ne pas faire varier la période de temps choisie pour le recueil des urines. La meilleure période semble être de 6 heures à 9 heures (109).

c) Urines de 4 heures (8 heures - 12 heures)

Une corrélation est trouvée par MAUTALEN entre le rapport hydroxyproline/créatininurie des urines de 24 heures et celui des urines du matin de 8 heures à 12 heures. Elle n'a pas été retrouvée par BERNARD (13).

DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE RAPPORTÉE

1 - A LA SURFACE CORPORELLE

Nous avons déjà vu que cette méthode est volontiers utilisée dans la mesure de l'hydroxyproline chez l'enfant, plus que chez l'adulte.

Le taux de l'hydroxyproline sur 24 heures est le plus élevé pendant l'adolescence et s'avère aussi élevé chez l'adulte et chez le nourrisson lorsqu'on le corrige en fonction de la surface corporelle.

2 - A LA CREATININURIE

Ce procédé permet d'éliminer le handicap des urines de 24 heures dont le volume n'est pas connu et dont on a prélevé un échantillon. Il évite les difficultés inhérentes à la collecte des urines chez les enfants.

Le rapport à la créatinine corrige les variations dues à la stature.

Le rapport hydroxyproline/créatininurie donne un profil très semblable à celui de la rapidité de croissance.

L'hydroxyproline urinaire est discrètement supérieure chez l'homme, par rapport à la femme. Le rapport hydroxyproline/créatininurie est le même pour les deux sexes.

Les filles éliminent plus de créatinine que les garçons (354 mg chez les filles pour 254 mg chez les garçons).

Les variations de l'hydroxyproline de 48 heures rapportée à la créatinine semblent apporter une précision plus grande dans le dosage.

Le rapport se calcule en divisant les micromoles d'hydroxyproline par ml et les micromoles de créatinine par ml.

.../...

3 - A LA PROLINE

Bien que n'étant pas une indication spécifique de la dégradation des protéines fibreuses du tissu conjonctif, la proline est liée au métabolisme du collagène.

En l'absence de protéinurie, la proportion entre la proline et l'hydroxyproline augmente chez les enfants d'une quantité de 1,2 à une quantité de 2,4 chez les adultes.

Le rapport Pro/HP augmente régulièrement dans les urines depuis l'enfance jusqu'à l'âge adulte où il demeure constant et semblable chez les hommes et chez les femmes. Le rapport est minimal entre 1 et 10 ans. Il augmente régulièrement entre 10 et 25 ans, pour se stabiliser au-dessus de 30 ans (76).

Dans les conditions pathologiques accompagnées d'une excrétion accrue d'hydroxyproline urinaire, la quantité de proline par rapport à l'hydroxyproline est abaissée. On peut interpréter ces variations comme des modifications dans la proportion des peptides urinaires dues aux polypeptides du collagène et ceux qui ne proviennent pas du collagène.

DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE DANS LES TISSUS

Le dosage de l'hydroxyproline tissulaire est de détermination difficile.

Les meilleurs résultats ont été obtenus à partir de tissus riches en collagène : peau, tendon, os.

TOUGAARD (132) détermine l'hydroxyproline tissulaire après hydrolyse du tissu osseux grâce à une modification de la méthode de BERGMAN et LOXLEY, FIRSCHEIN et SHILL et STEGEMAN. La quantité d'hydroxyproline déterminée ainsi par lui dans le tissu osseux (au niveau de la crête iliaque antéro-supérieure) est de 3×10^5 u mol./kg.

/ HYDROXYPROLINE /

VARIATIONS PATHOLOGIQUES DE L'EXCRETION URINAIRE DE L'HYDROXYPROLINE

I - MALADIES DES OS ET DU TISSU CONJONCTIF

A - Cancer secondaire des os

L'hydroxyproline urinaire subit une augmentation parfois très élevée mais inconstante en relation avec l'intensité et l'étendue des lésions.

Dans les cancers ostéolytiques et ostéocondensants, il y a une hyperhydroxyprolinurie. Dans le premier cas, il y a une corrélation positive avec la calciurie et les phosphatases alcalines. Dans la deuxième, avec les phosphatases alcalines mais la corrélation est négative avec la calciurie (130 - 131 - 25). Sous traitement hormonal ou cytolytique, l'hydroxyproline diminue. PLATT et Coll. pensent qu'elle reflète l'activité du cancer et serait donc un indice pronostic.

GUZZO et Coll. trouvent une corrélation plus significative dans le rapport hydroxyproline/créatinine (que dans l'hydroxyproline de 24 heures), rapport qui a un grand intérêt dans le dépistage précoce des métastases osseuses.

Pour BOREL, les hypropeptides basiques sont augmentés dans les métastases.

L'hydroxyproline urinaire constitue un paramètre important pour l'évaluation des résultats d'un traitement.

B - Dans le myélome multiple

L'hydroxyproline est normale ou modérément élevée. LEJEUNE et Coll. trouvent une augmentation dans quatre cas sur dix. D'après ALLARD (2 B) cette augmentation est plus fréquente; il souligne d'autre part qu'elle n'est pas nécessairement en rapport avec l'augmentation des phosphatases alcalines.

C - Dans le rachitisme

Comme dans l'ostéomalacie, l'hydroxyproline urinaire est élevée dans 50% des cas. Elle est augmentée dans les formes majeures, diminuée dans les formes mineures.

D - Dans l'ostéomalacie

L'augmentation est assez fréquente, surtout dans les ostéomalacies par malabsorption lors des paraplégies. Cette augmentation relève directement de l'hyperparathyroïdie secondaire dont témoignerait l'élargissement des surfaces de résorption chez les ostéomalaciques.

E - Dans l'ostéoporose

D'après EISINGER (26 B) et LATINEN (57 A) il y aurait une augmentation de l'hydroxyproline urinaire dans les ostéoporoses actives qui sont caractérisées par un taux de renouvellement accéléré. On retrouve cette augmentation au cours des algodystrophies au début, des ostéoporoses du sujet jeune. Au contraire, il y aurait une diminution de l'hydroxyproline urinaire dans les ostéoporoses involutives qui sont caractérisées, elles, par un taux de renouvellement diminué. On retrouve cette diminution dans les immobilisations à la phase tardive, dans les ostéoporoses séniles (19 A).

F - Au cours de la maladie de Paget

L'hydroxyproline urinaire est habituellement augmentée (taux moyen de 110 mg/24 heures pour 100 malades) (EISINGER 27 A). Cette augmentation est en relation avec l'étendue, l'évolutivité de la maladie de Paget et l'étude histologique de biopsies osseuses (68). Ainsi, les dosages répétés de l'hydroxyproline au cours du traitement de la maladie permettent d'en suivre l'efficacité (68).

G - Au cours des rhumatismes inflammatoires

Dans la polyarthrite chronique évolutive, l'hydroxyproline urinaire est peu modifiée, semblant augmentée seulement dans les formes graves; elle permet de suivre l'efficacité du traitement.

Pour BOREL, les hydropeptides acides sont augmentés dans la P.C.E.. MEILMAN note une absence du pic D par chromatographie.

Dans le R.A.A., l'hydroxyproline urinaire semble élevée.

H - Dans l'arthrose

L'hydroxyproline urinaire est normale chez les sujets atteints d'arthrose sauf en cas d'immobilisation prolongée.

I - Dans les fractures, l'ostéogénèse imparfaite

Il y a une augmentation de l'élimination urinaire d'hydroxyproline.

J - Dans le syndrome de Marfan

D'après DECKERS (21 A), l'élimination urinaire d'hydroxyproline est augmentée. LAINTINEN donne une augmentation dans 25 à 50% des cas. D'après JONES (141) ceci est dû à un défaut de maturation des fibres de collagène.

Cependant, certains auteurs estiment que cette augmentation est inconstante, en particulier chez l'adulte.

Nous avons étudié, dans le service de M. EISINGER, deux malades souffrant de maladie de Marfan. Les taux d'hydroxyproline étaient normaux. Il n'y avait pas de modification dans le cycle nyctéméral.

II - AFFECTIONS ENDOCRINIENNES

A - Hormone de croissance S.T.H.

La S.T.H. favorise la synthèse du collagène et augmente l'hydroxyproline urinaire par son action au niveau du pool du collagène soluble et insoluble.

L'hydroxyproline urinaire est élevée dans l'acromégalie évolutive. Elle est basse dans les nanismes hypophysaires (143).

Dans le traitement des nains hypophysaires par la S.T.H., il y a une augmentation de l'hydroxyprolinurie dont la mesure représente un test d'efficacité de la thérapeutique (76 B). De même, l'efficacité du traitement de l'acromégalie peut être confirmée par l'étude de l'hydroxyprolinurie.

B - Hormone thyroïdienne

L'hydroxyproline urinaire augmente constamment dans l'hyperthyroïdie, qu'il y ait ou non des signes cliniques ou radiologiques d'atteinte osseuse. Il existe une bonne concordance avec l'évolutivité de la maladie. Certains auteurs considèrent ce dosage comme aussi fiable que celui du "P.B.I." d'autant qu'il n'est pas sensible aux contaminations iodées KIVIRIKKO (112), MIROUZE (133).

Par contre, dans l'hypothyroïdie, l'hydroxyproline urinaire est diminuée, diminution souvent peu significative, surtout chez l'adulte où les taux minima normaux sont déjà bas.

KLEIN (118) et KIVIRIKKO (112) montrent qu'il y a une action sélective des hormones thyroïdiennes sur le métabolisme de l'ensemble du collagène de l'organisme. Elles augmentent sa synthèse et sa dégradation.

C - L'hormone parathyroïdienne

L'hydroxyproline urinaire s'élève nettement dans l'hyperparathyroïdie avec atteinte radiologique puis se normalise après traitement. KLEIN (140) pense que ce dosage après perfusion de calcium pourrait servir de test d'exploration fonctionnelle des parathyroïdes : le taux d'hydroxyproline urinaire diminue fortement chez le sujet normal mais non en cas d'adénome parathyroïdien.

Dans l'hypoparathyroïdie, il y a une légère diminution.

L'hormone parathyroïdienne augmente la résorption osseuse dont on ne sait si elle débute par une destruction organique ou par une mobilisation des sels minéraux. L'administration de parathormone à des sujets normaux ainsi qu'à des hypoparathyroïdiens provoque une augmentation de l'élimination de l'hydroxyproline urinaire.

D - Hormones sexuelles

Les oestrogènes, en raccourcissant la durée de vie des ostéoclastes, s'opposent à l'action de la parathormone. L'administration d'oestradiol ou d'oestriol est suivie d'une baisse de l'hydroxyproline urinaire.

L'hydroxyproline urinaire augmente dans le syndrome de Klinefelter et le syndrome de Turner.

Après anabolisant, KOWALEWSKI observe une hyperhydroxyprolinurie, BENDIT et EISINGER pratiquement aucune.

Pendant la grossesse, le taux d'élimination urinaire de l'hydroxyproline augmente (BOCCI - KLEIN).

E - Hormones corticosurréaliennes

L'hydroxyproline urinaire est normale dans le syndrome de Cushing. L'administration de cortisone à un sujet adulte normal n'entraîne aucune modification de l'hydroxyproline urinaire. Par contre, MATIASSEVIC et GERSHBERG (142) constatent chez de jeunes enfants atteints d'hypercorticisme un abaissement net de l'hydroxyproline urinaire.

Le cortisol agirait en diminuant la biosynthèse du collagène soluble ainsi que celle des M.P.S.

SIUKO montre que le cortisol diminue le taux de collagène soluble des tissus. Il a un effet antianabolisant, mais ne semble pas avoir d'effet sur le catabolisme des fibres collagènes.

Cependant, HOUCK a montré que l'administration de cortisol chez le rat, à des doses élevées, est suivie d'une baisse du collagène insoluble de la peau. D'après lui, l'hormone agirait en activant le système collagénolytique.

F - Au cours du diabète

Il y aurait une diminution de l'hydroxyproline urinaire (EISINGER) (25). Ceci est à rapprocher de l'étude de CLIVE R. HAMLIN et Coll. (18 B) sur le vieillissement du collagène dans le diabète. Il montre, à travers une étude sur des prélèvements de tendons, que l'âge apparent du collagène du diabétique enfant est significativement plus élevé que celui d'un sujet du même âge.

Ceci peut, peut-être, expliquer en partie les maladies vasculaires des diabétiques. Il est possible, selon cette étude, qu'une altération du tissu conjonctif précède le diabète et qu'elle joue un rôle dans sa pathogénie.

III - AU COURS DES COLLAGENOSSES, DES DERMATOSES

Les taux d'hydroxyproline urinaire au cours des affections du collagène sont variables, légèrement supérieurs à la normale, et il ne semble pas exister d'intérêt pratique dans son dosage notamment dans la sclérodermie, le lupus érythémateux, la dermatomyosite, la périartérite noueuse, la spondylarthrite ankylosante.

Dans le psoriasis, il existe une hyperhydroxyprolinurie en corrélation avec l'extension des lésions.

IV - MALADIES ET ETATS PATHOLOGIQUES DIVERS

A - Myopathie

Dans la myopathie pseudohypertrophique (maladie de Duchenne), où il existe une accumulation de collagène (les fibres musculaires sont remplacées par du tissu conjonctif), KIBRICK et Coll. notent une diminution de l'hydroxyproline urinaire avec une augmentation de la prolyl-hydroxyproline (129).

Dans la maladie de Steinert, EISINGER trouve aussi une diminution.

B - Dans les retards secondaires de la croissance

Dans le kwashiorkor, la sous-alimentation, les affections rénales chroniques, l'hypoxie par suite de vices cardiaques (76 B) il existe une baisse de l'élimination de l'hydroxyproline urinaire.

Au cours des états de malabsorption, on note une élévation de l'hydroxyproline urinaire qui reflèterait la carence nutritionnelle ou l'ostéomalacie. Il y a hyperhydroxyprolinurie lorsqu'existe une diminution de la calcémie ou des phosphatases alcalines (stimulation des glandes parathyroïdes).

WHITEHEAD (125) définit l'indice hydroxyproline :

$$\frac{\text{Hydroxyproline}}{\text{Créatinine}} \times \text{poids du corps}$$

Cet indice est diminué par rapport à la normale dans la malnutrition.

C - Dans la phase active des cirrhoses hépatiques, la formation des cicatrices, les brûlures, les poussées d'athérosclérose expérimentale chez le lapin, la lèpre lépromateuse, l'hydroxyproliémie familiale, il a été noté une élimination accrue de l'hydroxyproline urinaire.

V - THERAPEUTIQUES POUVANT INFLUENCER L'HYDROXYPROLINE URINAIRE

A - Thérapeutiques augmentant l'élimination de l'hydroxyproline

1 - L'acétylhydroxyproline (JONCTUM)

Ce produit qui contient de l'hydroxyproline augmente le taux urinaire.

2 - Les vasodilatateurs

Ils semblent augmenter l'élimination urinaire. Ainsi, RECORDIER et EISINGER (134) notent après injection I.V. de vasodilatateurs et chez des sujets traités par HYDERGINE* que le taux moyen s'élève de façon significative.

3 - Les barbituriques

En favorisant l'apparition d'une ostéomalacie, ils seraient susceptibles de provoquer une augmentation de l'hydroxyproline urinaire.

4 - Les substances lathyrogènes

Le bêta-amino-propionitrile-fumarate par exemple inhibe les enzymes extracellulaires lysyl et hydroxyllysyl-oxydases. Ceci entraîne une augmentation du taux de collagène soluble.

Ils provoquent une augmentation du taux d'hydroxyproline urinaire.

5 - Les médications anabolisantes

Rappelons qu'elles augmentent le taux d'élimination d'hydroxyproline urinaire comme le prouve aussi l'étude de AMIR (4) qui étudie la réponse au traitement par "oxymétholone" des enfants ayant un retard de taille d'origine inconnue.

B - Thérapeutiques qui diminuent l'élimination d'hydroxyproline

1 - La calcitonine

Dans les affections à turn-over élevé comme la maladie de Paget, l'hyperthyroïdie, la calcitonine provoque une diminution de l'hydroxyproline urinaire.

Au cours de la maladie de Paget, la surveillance de l'hydroxyproline urinaire se révèle être un bon critère d'efficacité du traitement par la calcitonine. Sa diminution est plus sensible avec la calcitonine de saumon qu'avec la calcitonine de porc (26 C).

D'autre part, il existe une corrélation entre l'hydroxyproline et les tests d'hypocalcémie provoquée par la calcitonine, tests qui semblent être un bon reflet de l'activité métabolique du tissu osseux.

2 - La mithramycine

Antibiotique cancérostatique, elle agit en altérant les mécanismes cellulaires de la synthèse protéinique. Elle provoque une chute très nette du taux d'hydroxyproline urinaire (EISINGER) (26 A).

3 - Le corticoid

Nous avons déjà signalé que chez l'adulte il n'a que peu de répercussion sur l'élimination d'hydroxyproline et que par contre, chez l'enfant, l'administration de Prednisolone provoque une diminution importante de l'hydroxyprolinurie.

4 - L'acide acétyl salicylique

100 mg/kg de poids d'aspirine administrés pendant une semaine chez des enfants de 5 à 7 ans provoquent une chute importante de l'hydroxyproline urinaire.

5 - Les oestrogènes

Ils raccourcissent la durée de vie des ostéoclastes et favorisent, à faible dose, l'apparition des ostéoblastes. Rappelons qu'ils entraînent une baisse de l'hydroxyproline.

6 - La diphénylhydantoïne

Elle provoquerait une baisse du taux d'hydroxyproline urinaire.

7 - La D-pénicillamine

La D-pénicillamine, utilisée dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, intervient sur le métabolisme du collagène au niveau de la lysyl oxydase.

INTERETS PRATIQUES DE L'ETUDE DE L'HYDROXYPROLINURIE

La littérature sur l'analyse de l'hydroxyproline urinaire est très abondante. Il apparaît que l'augmentation de l'excrétion est spécialement nette dans les affections du métabolisme de l'ensemble du collagène du corps, comme dans les maladies endocriniennes et dans les affections osseuses importantes. En effet, nous avons déjà mentionné que seules des modifications métaboliques importantes pouvaient entraîner une variation nette du taux d'hydroxyprolinurie.

On peut donc dégager un intérêt pratique de l'étude de l'hydroxyprolinurie. Nous nous référerons à O. LAITINEN (57) qui a travaillé sur plus de 10.000 cas.

Ainsi, bien que les valeurs pathologiques de l'élimination urinaire de l'hydroxyproline ne soient pas spécifiques, les conditions relativement rares qui la modifient sont presque toujours facilement identifiables sur les bases de l'histoire clinique et des symptômes.

On peut penser que la détermination du taux d'hydroxyproline totale dans les urines est intéressante au cours des maladies suivantes :

- Maladies osseuses métaboliques comme la maladie de Paget, l'ostéomalacie et le myélome multiple. L'hydroxyprolinurie représentant à la fois le taux de synthèse et de dégradation. Son étude au cours des ostéoporoses permet, pour EISINGER, de déterminer les indications thérapeutiques.

- Trois maladies endocriniennes : acromégalie, hyperthyroïdie et hyperparathyroïdie

- Syndrome de Marfan - L'augmentation nette de l'hydroxyprolinurie peut aider le diagnostic mais si le taux est normal ne permet pas de l'infirmier.

- Les cas difficiles où il existe un taux élevé de phosphatases alcalines avec un trouble du métabolisme calcique (hypercalcémie, hypercalciurie). L'élévation simultanée du taux d'hydroxyprolinurie implique une origine osseuse.

ETUDES DE L'HYDROXYPROLINE LIBRE

Les variations de l'hydroxyproline libre urinaire, même en cas d'altérations de l'excrétion rénale, sont parallèles aux variations de l'hydroxyproline totale. L'hydroxyproline urinaire libre représente 5% du total chez le sujet adulte normal.

Cependant, ce taux varie et est augmenté dans l'hyperparathyroïdie et l'insuffisance rénale chronique sévère surtout, mais aussi dans le syndrome de Fanconi, dans les atteintes rénales avec baisse de la réabsorption de l'hydroxyproline.

Du point de vue clinique, le dosage de l'hydroxyproline libre urinaire a seulement un intérêt en cas d'hyperparathyroïdie où elle est toujours très élevée par rapport à l'hydroxyproline totale. Cela est probablement dû à l'effet sur son transport dans le rein.

ETUDE QUALITATIVE DES HYPROPEPTIDES URINAIRES

De très nombreuses études, nous l'avons déjà signalé, se rapportent à l'étude quantitative de l'élimination urinaire des hypropeptides. Mais très peu considèrent leur aspect qualitatif. BOURRILLON (16), CHERIAN (18), KASUYA (52), BOULANGER (15).

MEILMAN (67) décrit 7 ou 8 hypropeptides chez le sujet normal.

On distingue les peptides urinaires dialysables contenant de l'hydroxyproline séparés par chromatographie sur QAE-Sephalex et les peptides adialysables séparés sur phosphocellulose.

1 - Les hypropeptides dialysables

BOREL en 1975 (91 B) estime qu'il n'y a pas de différences qualitatives entre les hypropeptides urinaires dialysables du sujet normal et de malades souffrant de maladie de Paget ou de métastases osseuses.

2 - Les hypropeptides non dialysables

HADDAD (42) démontre que le taux des hypropeptides non dialysables reflète la formation du collagène osseux. KRANE (56) montre leur augmentation dans la maladie de Paget et ANASUYA (5) démontre leur diminution dans la fluorose. BOREL retrouve les différences qualitatives des hypropeptides non dialysables par rapport au sujet normal en cas de maladie de Paget.

VARIATIONS DE L'HYDROXYPROLINURIE LIEES A L'INFLUENCE DE CERTAINES
 SUBSTANCES

Substances	Effet anti-catabolique ou anabolique	Effet anti-anabolique ou catabolique	L'excrétion d'hydroxy- proline est en général
Hormones thyroïdiennes		+	↑
Parathormone		+	↑
Hormone somatotrope	+		↑
Calcitonine	+		↓
Oestriol-oestradiol	+		↓
Corticostéroïdes ..		+	* ↑↓
Agents cytostatiques		+	↓
Mythramycine	dans la maladie		↓
Diphosphonate	de Paget		↓
Vitamine D	dans le rachitisme sen- sible à la vitamine D		↑
Vitamine C	dans l'ostéogénèse imparfaite		↘
* dans l'exploration expérimentale			
↑ augmentation de l'excrétion d'hydroxyproline			
↓ baisse de l'excrétion d'hydroxyproline			
↘ baisse légère de l'excrétion d'hydroxyproline			

(Tableau emprunté à la notice du réactif hypronosticon)

B -- ETUDE DU METABOLISME DE L'ELASTINE

Les études du métabolisme de l'élastine sont essentiellement faites par les équipes de fundamentalistes.

De par sa distribution préférentielle, elles ont essentiellement porté sur le métabolisme de l'élastine dans la paroi des vaisseaux.

Cependant, l'élastine extraite de la peau a été largement étudiée. PIEZ et Coll. en 1965 ont porté leur attention sur l'élastine tégumentaire.

A - Méthodes d'étude

1 - Pour l'analyse des polypeptides de l'élastine, nous ne citerons que la méthode utilisée par DAVIL (20) et SHIMADA et Coll. respectivement sur aorte de porc et ligaments larges de boeuf.

Un des substrats de départ est constitué par le résidu d'élastine fibreuse obtenue après extraction progressive des différents constituants de l'aorte de porc et élimination des glycoprotéines acides résiduelles qui sont fortement associées à l'élastine. Une purification est effectuée dans ce but par un traitement par la sonde 0,1 N pendant 45 minutes à 37°C.

Les autres substrats étudiés sont formés par les élastines solubles faiblement ou hautement réticulées obtenues par une extraction fractionnée en milieu organo-alcalin (ROBERT).

La digestion par l'élastase cristalline (B. GRADE) (Calbiochem) est effectuée en tampon bicarbonate d'ammonium 2,2 M et pH 8,8 pendant 6 heures à 37°C. Le rapport enzyme-substrat est de 1 pour 100. L'hydrolysat total est ensuite soumis à une gel-filtration sur colonne de Sephadex G 25 (2,5 x 200 cm) (Pharmacia) et l'élution est obtenue par l'acide acétique 0,2 N. Les fractionnements sur phosphocellulose (Cellex P) (Biorad) et Dowex 50 x 2 (200-400 mesh) (Fluka) sont effectués selon le procédé de Shimada. Les déminéralisations sont réalisées sur petite colonne de Sephadex G 25. Les repérages de peptides sont obtenus par mesure de l'absorption à 278 nm, par réaction à la ninhydrine et par la réaction de Lowry.

Les réactifs utilisés sont de qualité analytique. Les analyses d'acides-amino sont réalisées sur auto-analyseur Technicon et les dosages des desmosines sur analyseur Jeol JLC-5 AH.

2 - Les études des interactions élastine-lipides ont généralement été faites en mettant en présence l'élastine et des solvants organiques (interactions hydrophobes dans la structure de l'élastine).

ROBERT (84) en nourrissant des rats avec un régime riche en cholestérol C 14 a pu mettre en évidence une fixation de cholestérol radio-actif dans les fibres élastiques de l'aorte de ces rats.

3 - Autres techniques

Nous ne ferons que citer les autres techniques qui sont aussi réservées aux laboratoires de recherche :

- Culture de tissus (144 - 147 - 148)
- Incorporation de produits radioactifs
 - . 149
 - . 5-41 de 84
 - . ANWAR [bibliographie de FONTAINE (30)]
- Electrophorèse sur papier : 26 de 84
- Techniques immunologiques : 31 - 40 - 45 - 51 - 52 de 84
- Microscopie électronique :
 - . 146
 - . ROBERT (85)
- Hydrolyse enzymatique : 9 - 11 - 6 - 15 de 20
11 de 85

B - Intérêt en pathologie

Les études effectuées sur l'élastine et les élastases ces dix dernières années par les équipes de fundamentalistes permettent de mieux comprendre le processus pathogénétique du vieillissement et de l'artériosclérose au niveau moléculaire et cellulaire.

Ainsi, d'après ROBERT (84) "il apparaît que l'élastigénèse normale reste possible dans une paroi artérielle âgée mais qu'elle s'effectue en désordre, probablement à cause de la synthèse déséquilibrée des constituants moléculaires de l'élastine. Le ralentissement du processus enzymatique du pontage peut également jouer un rôle. Un rapport inversé entre glycoprotéines de structure et élastine semble être accompagné par l'apparition d'une phase cristalline d'hydroxyapatite. La très grande affinité de l'élastine pour les lipides permet d'expliquer par le mécanisme "d'intercalage hydrophobe" l'apparition de dépôts lipidiques intramoléculaires entre les chaînes peptidiques de l'élastine, contribuant considérablement à la labilisation des fibres et à la perte d'élasticité de nos tissus élastiques avec l'âge.

L'apparition d'une élastase artérielle doit probablement expliquer la fragmentation et la dégradation de nos fibres élastiques".

Rappelons d'autre part l'hypothèse immunologique concernant l'importance des auto-anticorps anti-lipoprotéines et anti-élastine dans la gènèse de l'artériosclérose.

*

* *

C - ETUDE DU METABOLISME DES GLYCOSAMINOGLYCANES

I - EXPLORATION DE LA SYNTHÈSE DES GLYCOSAMINOGLYCANES

Elle est essentiellement étudiée par l'incorporation de soufre marqué par les cultures de fibroblastes. La première étude fut réalisée par DZIEWATJOWSKI en 1949 (145).

Grâce à cette technique par exemple, il a pu être démontré qu'au niveau du cartilage articulaire, les complexes protéine-polysaccharides sont synthétisés par les chondrocytes.

En combinant l'incorporation du ^{35}S et du ^{14}C qui permettent l'étude des synthèses polysaccharidiques et protéiques, GROSS et Coll. ont montré qu'au niveau du cartilage ces synthèses s'effectuent à la même vitesse.

Les autoradiographies au ^{35}S sont utilisées comme témoins indirects mais fidèles de la synthèse des polysaccharides du cartilage. Ceci bien que la sulfatation de ces substances forme peut-être le signal de fin de synthèse des chaînes polysaccharidiques. VIGNON (102)

Ces études, qui sont bien entendu du domaine de la recherche, ont été faites au cours de diverses pathologies.

Par exemple, l'incorporation du ^{35}S -sulfate dans les protéoglycanes de la paroi aortique est accélérée sous l'influence de l'hypertension artérielle.

L'augmentation de l'incorporation du ^{35}S -sulfate dans les glycosaminoglycanes sulfatés est une des premières altérations métaboliques dans l'artériosclérose spontanée et expérimentale alors que le taux diminue normalement avec l'âge (45).

Les résultats les plus intéressants furent obtenus dans les mucopolysaccharidoses. En utilisant le $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ comme précurseur, FRATANTONI et NEUFELD (74) ont montré qu'il existait une accumulation pathologique de M.P.S. marqués dans les fibroblastes de malades ayant une mucopolysaccharidose autre que le syndrome de Morquio. Cette découverte, faite alors que la structure fine et l'enzymologie du D.S. et de l'H.S. étaient mal connues, permit par la suite de mettre en évidence la correction du trouble par des "facteurs correctifs" et ainsi de mettre en évidence les déficits enzymatiques.

A ce niveau, nous citerons MAC KUSICK : "Dans les mains de NEUFELD et coll. l'étude des fibroblastes au cours d'anomalies du métabolisme du M.P.S., particulièrement par l'étude avec du ^{35}S , a illustré le principe émis par William HARVEY". "De rares anomalies nous enseignent le normal".

L'incorporation du ^{35}S et la métachromatie cytoplasmique des cellules amniotiques ont permis aussi de déceler des mucopolysaccharidoses anténatales (34) FRATANTONI.

Toujours au stade du diagnostic anténatal de ces affections, d'autres techniques d'étude ont été proposées. Ainsi l'étude chimique du liquide amniotique (66) MATALON.

Selon ces auteurs, le taux normal de M.P.S. dans le liquide de ponction amniotique dans le 2ème trimestre est de 0,02 mg/ml. Au cours de la maladie de Hurler, ce taux passe à 0,087 mg/ml. Normalement, 80% sont constitués par de l'acide hyaluronique, 13% par du D.S. Au cours de la maladie de Hurler, il y aurait 63% de H.S. Cependant, les mêmes auteurs en 1972 concluent que l'étude chimique ne suffit pas mais qu'il est nécessaire de cultiver les cellules.

II - ETUDE DE LA DEGRADATION DES GLYCOSAMINOGLYCANES

Cette étude est, en pratique, essentiellement basée sur l'analyse des M.P.S. urinaires. Mais au stade de la recherche sont étudiées aussi des enzymes procédant à la dégradation des mucopolysaccharides et en particulier des hyaluronidases et de certaines enzymes lysosomiales. Nous avons vu qu'une partie des glycosaminoglycanes dégradés se retrouve dans les urines sous forme d'oligo saccharides.

A - LES GLYCOSAMINOGLYCANES URINAIRES

- I - Techniques d'étude des glycosaminoglycanes urinaires
- II - Etude de la mucopolysaccharidurie normale
- III - Variations pathologiques
- IV - Etude de la mucopolysaccharidurie dans les mucopolysaccharidoses

B - CULTURE DE CELLULES

C - ENZYMES LYSOSOMIALES

A - LES MUCOPOLYSACCHARIDES URINAIRES

I - Techniques d'étude des glycosaminoglycanes urinaires

Il existe de nombreuses méthodes ⁺ spécifiques.

Ainsi, BERRY et SPINANGER en 1960 (14 A) ont décrit un test grossier de dépistage des mucopolysacchariduries massives. Il s'agit d'un test colorimétrique simple utilisant la métachromasie des M.P.S. au bleu de toluidine.

On évapore un échantillon d'urine à tester sur un papier filtre que l'on plonge dans une solution de bleu de toluidine. Après décoloration du papier, il n'y a normalement aucune métachromatie. La persistance d'une tache pourpre homogène reflète la présence d'une quantité élevée d'acide chondroïtine sulfurique.

Mais il faut savoir que cette méthode donne des résultats très variables, d'où l'intérêt de la répéter sur des urines de 24 heures.

Afin de différencier les formes libres, polymérisées ou liées à des protéines, le dosage des glycosaminoglycanes urinaires nécessite pour être valable un isolement préalable de la fonction proprement mucopolysaccharidique.

Ainsi, l'étude classique des glycosaminoglycanes urinaires doit comprendre les différentes étapes suivantes :

- digestion de la partie protidique
- extraction de la fraction mucopolysaccharidique
- enfin dosages quantitatifs et qualitatifs

A - Digestion de la partie protidique

Cette séparation se fait par hydrolyse :

- Hydrolyse chimique avec la soude
 - . Méthode longue
- Hydrolyse enzymatique
 - . par la pepsine ou la trypsine surtout
 - . par des extraits pancréatiques (GARDELL)
 - . par la papaïne

.../...

B - Extrait de la fraction mucopolysaccharidique

La dialyse permet d'éliminer les sels, les acides aminés ou les peptides et les autres molécules de faible poids moléculaire, en retenant les macromolécules polysaccharidiques. Cette méthode est simple mais entraîne une perte des M.P.S. dialysables (de faible P.M.) soit environ 15% des M.P.S. totaux.

Le chauffage de la membrane permettrait de diminuer cette perte en diminuant le diamètre des pores.

L'extraction peut se faire en milieu alcoolique à concentration croissante (MEYER).

M.P.S. qui précipite	Concentration en alcool dans un tampon d'acétate de Ca
D.S.	18 à 25%
CS.A.	30 à 40%
CS.C	40 à 50%

La méthode d'ASTRUP utilise la précipitation par un hydrochlorure de benzène.

Elle permet l'isolement d'un produit urinaire non dialysable constitué en majeure partie de M.P.S. acides (glycosaminoglycanes).

La formation de complexes insolubles avec des ammonium quaternaires est la méthode la plus employée (Technique de DI FERRANTE et RICH) (22 A).

Les ammonium quaternaires forment des complexes avec toutes les molécules polyanioniques et donc avec les glycosaminoglycanes (on pourrait aussi compléter le K.S. qui est électriquement neutre en présence de borate et en milieu alcalin).

Les composés les plus utilisés sont :

- le bromure de cétyl-triméthyl-ammonium C.T.A.B.
- le chlorure de cétyl-triméthyl-ammonium
- le chlorure de cétyl pyrimidine C.P.C.

La solubilité du complexe croît avec la température. On doit donc laisser reposer le complexe à froid pendant plusieurs heures et recueillir ensuite le précipité par centrifugation.

Mais pour MATHEWS les M.P.S. acides urinaires étant dispersés et de poids moléculaires les plus bas, cette technique est donc souvent incomplète.

Pour BOAS cette technique précipiterait non seulement des M.P.S. mais aussi des glycoprotéines.

De même, ROSENFELD (89) indique que beaucoup moins d'acides hexuroniques sont précipités par un sel d'ammonium quaternaire que si l'analyse est directe sur des urines non dialysées.

GOLBERG et COTLIER (41 A) indiquent qu'il faut utiliser le C.T.A.B. à une concentration supérieure à 2,5 mg/ml et qu'il faut exprimer les résultats par rapport à la créatinine, en accord avec LIPSCOMB et DI FERRANTE.

Auteurs	Dialyse	Précipitation à l'éthanol	Gel filtration	0,5% CPC OR CTAB	0,5% CTAB
DI FERRANTE et RICH (22 B)				+	
TELLER (92)				+	
LINKER et TERRY (59)				+	
ALLALOUF et BEV (2 A)				+	
VARADI (98)	+		+		
MURATA (72)	+			+	
ROSENFELD	+				
BERENSON et DALFERES (12)	+	+			
GOLDBERG et COTLIER (41 A)					+

D'après GOLDBERG et COTLIER

C - Dosages des glycosaminoglycanes urinaires

1 - Etude quantitative

On apprécie la quantité des glycosaminoglycanes urinaires par le dosage de leurs éléments caractéristiques : dosages des hexosamines et des acides uroniques.

. Dosage des hexosamines

Il se fait par la méthode d'ELSON-MORGAN modifiée par SCHLOSS (90 B) et BOAS.

Le principe de cette méthode repose sur la formation d'un complexe coloré avec le réactif d'EHRlich après avoir traité les hexosamines par l'acétyl acétone.

On peut, d'autre part, doser séparément la glucosamine ce qui permet d'étudier leur rapport.

. Dosage des acides uroniques

C'est actuellement la méthode la plus employée pour évaluer la quantité de glycosaminidases urinaires, après précipitation par les ammonium quaternaires.

Diverses méthodes permettent ce dosage :

- Méthode au carbazol
- Méthode au naphtoresorcinol
- Méthode à l'orcinol qui semble actuellement la plus utilisée

. Dosage des sucres neutres

On utilise l'anthrone qui colore les sucres en bleu dans une solution sulfurique.

L'étude quantitative fait parfois appel au dosage des

- radicaux sulfates totaux
- radicaux acétyl
- radicaux N-sulfate

2 - Etude qualitative

- Le fractionnement des glycosaminoglycanes peut être effectué en utilisant

- . soit la solubilité des complexes avec les composés ammonium quaternaires
- . soit les propriétés anioniques des glycosaminoglycanes

La chromatographie peut être réalisée sur papier, sur gel d'agarose, sur colonne surtout actuellement.

- La digestion enzymatique des fractions est également utilisée

- L'étude des rapports des méthodes colorimétriques de dosage (carbazol/naphtorésorcinol, carbazol/orcinol) permet d'identifier les composants mucopolysaccharidiques dans les urines.

M.P.S.	C/N
Urines de sujets normaux	10 - 15
CS.A.	13,6
D.S.	0,6
CS.C.	14,0
H.S.	12,2

Mais cette technique est moins utilisée actuellement.

- L'étude qualitative des produits fractionnés peut se faire par

- . digestion enzymatique
- . méthylation
- . étude du pouvoir rotatoire de la lumière
- . mesure du spectre infrarouge
- . mesure de viscosité

Auteurs	Enzyme	Echange d'ion	Electrophorèse	Acide uronique seul	Etude complète	Créatinine
DI FERRANTE et RICH (22 B)				+		+
TELLER (92)				+		
LINKER et TERRY (59)				+		
ALLALOUF et BEV (2 A)	+			+		
VARADI (98)	+	+	+		+	
MURATA (72)	+	+	+	+		
ROSENFELD (89)					+	+
BERENSON et DALFERES (12)	+	+	+		+	
GOLDBERG et COTLIER (41 A)	+		+		+	+

D'après GOLDBERG et COTLIER

11 - Etude de la mucopolysaccharidurie normale

La mucopolysaccharidurie se mesure donc le plus souvent en appréciant la quantité d'acides uroniques du complexe. Il semble préférable d'exprimer les résultats en milligrammes d'acide glycuronique par gramme de créatinine. Les chiffres normaux sont variables selon les auteurs. La moyenne cependant est inférieure à 10 mg par 24 heures (exprimée en acide glycuronique). Pour MAROTEAUX, les valeurs normales seraient inférieures à 10 mg par litre chez l'enfant et inférieures à 5 mg chez l'adulte.

Mise à part l'héparine, tous les glycosaminoglycanes ont été retrouvés dans l'urine humaine normale, mais la majeure partie est représentée par l'acide chondroïtine sulfurique.

L'influence du sexe est discutée et la majorité des auteurs semble ne pas trouver de variations.

Par contre, l'âge joue un rôle important : les taux seraient environ 25% plus élevés chez les enfants.

Les variations individuelles semblent assez importantes d'un jour à l'autre et dans le nycthémère avec un pic d'excrétion à 18 - 22 heures (90 C).

III - Variations pathologiques

Les anomalies les plus importantes et les mieux connues se rencontrent dans les dystrophies héréditaires.

L'étude des variations pathologiques de la mucopolysaccharidurie rejoint en effet celle des mucopolysaccharidoses.

Elle a cependant été faite en dehors des dystrophies. Des séries d'études importantes ont été réalisées par FREZET dans sa thèse (33). Nous citerons quelques résultats obtenus qui sont en accord avec les autres auteurs dans les cas où l'étude a été réalisée :

- Polyarthrite rhumatoïde
- Ostéoarthrites tuberculeuses
- Goutte
- Maladie de Paget
- Dysglobulinémies

Dans ces affections les taux étaient augmentés.

Mais l'étude de la mucopolysaccharidurie est principalement intéressante en clinique dans le cadre des mucopolysaccharidoses.

IV - ETUDE DE LA MUCOPOLYSACCHARIDURIE DANS LES DESORDRES DU METABOLISME DES GLUCIDES ET DES LIPIDES EN PATHOLOGIE OSSEUSE DE L'ADULTE

1 - Les mucopolysaccharidoses

Les anomalies les plus importantes et les mieux connues se rencontrent dans les dystrophies héréditaires.

BRANTE, en 1952, introduisit cette notion après avoir trouvé une surcharge en M.P.S. dans les tissus de maladie de Hurler.

Puis DORFMAN et LORINCZ, en 1957, découvrirent une excrétion anormalement élevée des M.P.S. urinaires dans cette maladie.

Ultérieurement, MEYER et coll. confirmèrent ces résultats et montrèrent qu'il y avait dans la maladie de Hurler une surcharge et une excrétion particulièrement élevées en dermatane sulfate.

Ces découvertes conduisirent à d'autres recherches qui permirent de trouver une anomalie de la mucopolysaccharidurie dans de nombreuses dystrophies actuellement rassemblées sous le terme général de "mucopolysaccharidoses". D'autre part, à côté de ce groupe, il faut en distinguer un autre appelé mucolipidose. Dans ces maladies, si la surcharge lipidique est parfois au premier plan, l'existence d'un désordre portant sur les mucopolysaccharides est certaine.

PRINCIPALES MUCOPOLYSACCHARIDOSES. D'APRES MAC KUSICK (63)

MUCOPOLYSACCHARIDOSES DE TYPE I	HURLER
" II	HUNTER
" III	SANFILIPPO
" IV	MORQUID
" V	ULLRICH, SCHEIE
" VI	MAROTEAUX, LAMY

MUCOLIPIDOSES

MUCOLIPIDOSE I	SPRANGER, WIEDEMANN
" II	LEROY, OPITZ
" III	Pseudo-polydystrophie
FUCOSIDOSE	
MANNOSIDOSE	
GANGLIOSIDOSE GENERALISEE	
SULFATIDOSE AVEC MUCOPOLYSACCHARIDURIE (AUSTIN, THIEFFRY)	

Les mucopolysaccharidoses sont des affections dans lesquelles un défaut de la dégradation des glycosaminoglycanes est responsable d'une surcharge viscérale et d'importants troubles de la croissance enchondrale ainsi que de l'excrétion urinaire anormale de ces substances.

A - MALADIE DE HURLER = MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE I

Parfois appelée polydystrophie de Hurler ou gargoylisme, la maladie de Hurler est caractérisée sur le plan biochimique par une surcharge des viscères en une substance de nature mucopolysaccharidique, du système nerveux par des gangliosides, et par l'augmentation du taux global des M.P.S. urinaires atteignant souvent des chiffres supérieurs à 50 mg par 24 heures. Cette augmentation concerne essentiellement deux types de M.P.S. : le dermatan-sulfate surtout et l'héparan-sulfate (cette dernière fraction expliquée par la petite proportion d'acide iduronique existant dans l'H.S.).

Il existe dans les fibroblastes une accumulation de M.P.S.

La maladie est due à un défaut de dégradation de ces substances (retrouvée dans les mucopolysaccharidoses de type II, III, V et VI) dû à un déficit enzymatique portant sur la L-iduronidase (NEUFELD et coll. - 75 A).

B - MALADIE DE HUNTER = MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE II

Les urines dans cette maladie contiennent deux fractions anormales d'héparan-sulfate et de dermatan-sulfate. La fraction d'héparan-sulfate est souvent plus importante que dans la maladie de Hurler mais surtout elle est constituée de deux sous-fractions dont les proportions diffèrent nettement de celles trouvées dans cette dernière affection.

Les granulations métachromatiques au bleu de toluidine sont présentes dans les fibroblastes en culture.

Le déficit enzymatique causal porte sur une sulfo-iduronate-sulfatase (BACH et coll. - 8).

C - MALADIE DE SANFILIPPO = MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE III

Elle est encore appelée oligophrénie polydystrophique. Il existe ici une élimination excessive d'héparan-sulfate alors que celle de dermatan-sulfate est faible ou absente.

L'étude des fibroblastes et de leur correction mutuelle a permis à NEUFELD de montrer que cette maladie recouvrait en fait deux affections.

Dans le type A, le déficit enzymatique porte sur une héparan-sulfatase (FIGURA et KRESS) (28); dans l'autre, le type B, il s'agit d'un déficit en N-acétyl-alpha-D-glucosaminidase.

D - MUCOPOLYSACCHARIDOSE TYPE VI (Nanisme polydystrophique) (maladie de MAROTEAUX-LAMY)

L'élimination urinaire est presque exclusivement constituée de dermatan-sulfate. Il semble exister deux formes dans ce type. MAROTEAUX, HORS et STRUMPF ont observé dans l'une un déficit en aryl-sulfatase B dans les fibroblastes. O'BRIEN a trouvé une déficience en N-acétylgalactosamine sulfatase.

E - MUCOPOLYSACCHARIDOSE TYPE V (MALADIE DE ULLRICHE-SCHIELE, SPÄT-HURLER)

L'étude des urines montre des anomalies identiques à celle que l'on observe dans la maladie de Hurler. Le déficit enzymatique porte aussi sur la L-iduronidase.

F - MALADIE DE MORQUIO : MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE IV (Chondrodystrophie spondyloepiphysaire)

La surcharge viscérale ne joue pas ici un rôle primordial dans l'évolution qui est conditionnée par la sévérité de l'atteinte osseuse.

Le kératan-sulfate est excrété dans les urines en quantité anormale. Il existe parfois aussi une légère augmentation de la fraction normale de chondroïtine-4 ou 6-sulfate. Il semble, d'après MAROTEAUX, que chez l'adulte, cette excrétion anormale se réduise et il devient alors très difficile de mettre le kératan-sulfate en évidence.

G - AUTRES MUCOPOLYSACCHARIDOSES

1 - THOMSON, PHILIPPART, SPRANGER ont étudié une mucopolysaccharidose avec élimination de chondroïtine-4-sulfate. Il ne semble pas que cette affection soit due à un déficit en bêta-glucuronidase comme il avait été d'abord pensé.

2 - Une mucopolysaccharidose de type VII est par contre sous la dépendance d'un déficit en bêta-glucuronidase. Le rapport carbazol-naphtoserine est dans ce cas égal à 4,60 (HUMBEL) (46 A). Les M.P.S. urinaires sont élevés.

3 - Il a été décrit des observations d'affections avec élimination anormale de kératan-sulfate différentes de la maladie de MORQUIO (MAROTEAUX) (65).

** On écarte maintenant du cadre des mucopolysaccharidoses des syndromes tel que celui de Winchester ou Dyggve où il n'existe pas de mucopolysaccharidurie anormale.

2 - Les mucolipidoses

Il existe dans ces affections une surcharge mixte de lipides et de mucopolysaccharides. L'élimination urinaire de ces derniers est normale, sauf dans la sulfatidose avec mucopolysaccharidurie.

A - LES MUCOLIPIDOSES TYPE I, II et III

Le type I est parfois appelé mucopolysaccharidose Gal + en raison de l'élévation de la bêta-galactosidase, qui est présente dans les tissus, mais non spécifique.

L'élimination urinaire des M.P.S. est normale dans les trois types.

B - FUCOSIDOSE-MANNOSIDOSE

Maladies secondaires à un déficit respectivement en alpha-fucosidase et en alpha-mannosidase.

L'élimination urinaire de M.P.S. est aussi normale.

.../...

C - GANGLIOSIDOSE A GM₁

Elle fut longtemps considérée comme une mucopolysaccharidose atypique. Les dosages enzymatiques montrent constamment une absence totale de la bêta-galactosidase. L'élimination urinaire de M.P.S. est normale.

Il existe un deuxième type : la gangliosidose à GM₁ de type II où il a été observé dans les tissus un déficit en isoenzymes B et C de la bêta-galactosidase.

D - LA SULFATIDOSE AVEC MUCOPOLYSACCHARIDURIE

C'est la seule affection du groupe des mucolipidoses où une anomalie dans l'excrétion urinaire des M.P.S. est relevée. Les proportions sont les mêmes que dans la maladie de Hurler mais il existe des sulfatides dans le culot de centrifugation.

Il semble que cette affection soit due à un déficit en arylsulfatases A, B, C.

B - CULTURE DE CELLULES

=====

Le fibroblaste est capable de synthétiser du collagène, de l'élastine, des mucopolysaccharides, mais aussi des systèmes enzymatiques.

Dans les mucopolysaccharidoses, où un déficit enzymatique bloque la dégradation, il existe dans les fibroblastes en culture une accumulation de M.P.S. qui peut être mise en évidence par la coloration métachromatique au bleu de toluidine. Si cette culture est faite en présence de sulfates marqués, il est noté une accumulation anormale de soufre radioactif. Il est possible de déterminer l'anomalie enzymatique spécifique de chaque variété par la correction in vitro du trouble par l'enzyme déficiente.

La culture de cellules du liquide amniotique permet le diagnostic prénatal.

C - LES ENZYMES LYSOSOMIALES

L'étude des glycosaminoglycanes hydrolases ou enzymes intervenant dans la dégradation des glycosaminoglycanes a fait de nombreux progrès.

Ces enzymes sont d'origine lysosomiale essentiellement et manifestent leur activité en pH acide.

Jusqu'à ces dernières années, leur détermination avait permis de poser ou de confirmer le diagnostic de certaines mucopolysaccharidoses, nous l'avons déjà souligné.

Mais actuellement de nombreuses enzymes sont étudiées :

- Bêta-N-acétyl-glucosaminidase
- Bêta-glycuronidase
- Arylsulfatase
- Bêta-galactosidase
- Alpha-mannosidase
- Alpha-glucosidase

Nous avons étudié deux d'entre elles : la Bêta-N-acétyl-glucosaminidase et la Bêta-glycuronidase. (Nous utiliserons comme abréviations :

- N.A.G. = N-acétyl-bêta-D-glucosaminidase
- Gly = Bêta-N-glycuronidase)

Il faut souligner que ces enzymes interviennent dans le catabolisme des glycoprotéines de structure.

1 - DOSAGE DE LA N-ACÉTYL-BÊTA-GLUCOSAMINIDASE DANS LES URINES

DEFINITION DE L'ENZYME

Il s'agit d'une enzyme appartenant au groupe des hydrolases; c'est une osaminidase c'est-à-dire qu'elle rompt la liaison osidique où sont engagés par leur groupement réducteur les oses aminés dont la fonction amine primaire est amidifiée.

La N-acétyl-bêta-glucosaminidase agit sur les composés comprenant :

- de la (D) glucosamine amidifiée par un groupement acétyl $\text{CO}-\text{CH}_3$
- liée par une liaison osidique bêta
- à un substituant R

Le substituant R est variable et permet de classer les différentes méthodes de dosage.

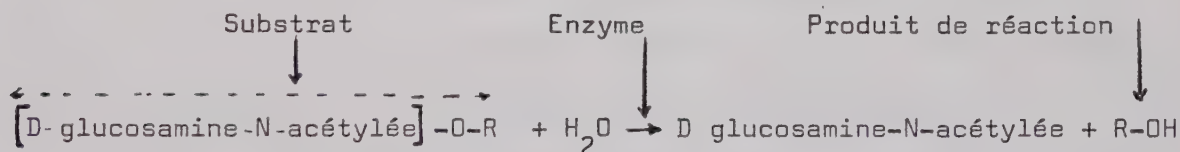
- R peut être du méthanol
du benzène
- ou encore R = paranitrophénol, base d'une méthode spectrophotométrique

R = 4 méthyl umbelliferone, base de la méthode fluorimétrique

L'enzyme porte un numéro attribué par une commission : EC 3.2.1.30 (3 parce que hydrolase, etc...).

Son appellation correcte est : bêta-2-acétamido-2-désoxy-D-glucoside-acétamido-déoxyglucohydrolase.

REACTION ENZYMATIQUE



L'activité enzymatique est évaluée en mesurant la quantité du produit R-OH apparu au cours de la réaction, dans des conditions opératoires bien définies.

CONDITIONS OPERATOIRES

L'enzyme possède un pH optimum d'action dans des zones "acides" de 4,3 à 4,75 selon le tampon utilisé.

La température utilisée pour la réaction est de 37°.

Le temps d'incubation selon les techniques varie de 30 minutes à 120 minutes.

Il faut savoir enfin qu'il y a inhibition compétitive par l'acétate, l'acétamide, la N-acétyl-glucosamine; ceci ayant pour conséquence pratique de ne pas pouvoir utiliser pour obtenir le pH optimum (4,6) de tampon acétate.

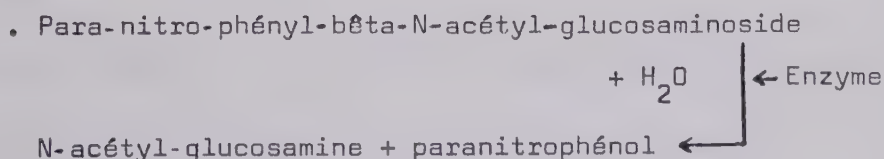
METHODOLOGIE

1) Le prélèvement urinaire :

- Sa durée : 24 heures ou une simple diurèse
En général, une simple diurèse semble suffire
- Conservation à + 4° : Il est possible de conserver l'urine à + 4° sans altérer l'activité enzymatique
- Centrifugation : En cas d'urines troubles il est possible d'effectuer une centrifugation préalable
- Dilution : Les urines contenant d'assez grandes quantités d'enzyme il faut les diluer; cette dilution doit se faire dans un milieu albumineux (sérum albumine bovine à 1 mg/ml). Ceci a pour but d'améliorer la stabilité de l'enzyme (SANDMAN C.C.A. 45 (1973) 349-359)
Il a été choisi une dilution au 1/10.
- Créatininurie : Afin d'augmenter la valeur de la méthode les résultats seront donnés par rapport aux mg de créatinine urinaire (méthode au Picrate alcalin après dialyse)

2) Méthode colorimétrique :

La réaction



.../...

- Après arrêt de la réaction, le paranitrophénol est dosé à pH = 10,5 au spectrophotomètre à 410 nM

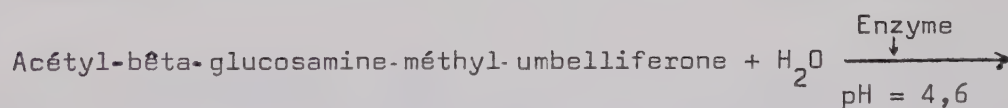
Les conditions opératoires

- Substrat : 5 milliMoles/l sous un volume de 0,3 ml en tampon citrate-phosphate pH = 4,5 - 0,15 nM
- Incubation à 37° pendant 60 minutes
- Urines : Après dilution en milieu albumineux, les urines sont amenées sous un volume de 0,1 ml
- Arrêt de la réaction : On peut arrêter la réaction avec 0,1 ml d'acide perchlorique à 10%
- Centrifugation : 5.000 g pendant 5 minutes
 - Recueil de 0,4 ml de surnageant
 - Ajout de tampon glycine-bicarbonate (pH 10,5 - 2 M)
 - Lecture au spectrophotomètre à 410 nM
 - Il faut opérer contre des "témoins" appropriés sans enzyme
 - Lecture de la densité optique obtenue (D - T) sur une gamme d'étalonnage préparée avec du para Nitro-phénol

3) Méthode fluorimétrique (dérivée de SANDMAN et WELLARS)

(90 A)

Réaction



N-acétylglucosamine + méthyl-umbelliferone

La méthyl umbelliferone libérée est convertie sous forme anionique à pH = 10,3 et passée au fluorimètre.

Réactifs

Substrat tamponné : pesée de 1 mg dans 5 ml tampon citrate pH = 4,6

.../...

Tampon citrate = 21 g acide citrique

200 ml soude N

Q.S.P. 1.000 ml eau distillée

Mélanger 80 ml de cette solution

20 ml d'HCL N/10

Contrôler le pH (méthode électrométrique)

Tampon glycolle 0,4 M pH = 10,3

Pesée : 3 g glycolle

Q.S.P. 100 ml eau distillée

Amener la solution à pH = 10,3 par de la soude

Mode opératoire

- Déterminer la créatininurie
- Diluer l'urine au 1/10 dans sérum albumine bovine à

1 mg/ml

	<u>Dosage</u>	<u>Témoin</u>
Substrat tamponné	0,4 ml	0,4 ml
Urine diluée	0,1	0,1
Tampon GLY 10,3	-	2
60 minutes à 37°		
Tampon GLY 10,3	2	-

- Lecture au fluorimètre avec les longueurs d'onde suivantes :

. Excitation : 368 nm

. Emission : 448 nm

- Faire un standard de méthyl umbellifère :

. Solution mère à 100 mMole/ml

↓
... Dilution 1/100

. Solution fille à 1 mMole/ml

{ . Solution fille 1 ml

{ . Tampon GLY 2 ml

lue au fluorimètre

.../...

Calcul

Faire $D - T$ D = degré fluorimétrique du dosage
 T = dosage fluorimétrique du témoin

Calculer le nombre de nanoMoles/ml à partir de la solution standard à 1 nM/ml

. Solution à 1 nM de M.u. $\rightarrow$ x degré fluorimétrique

. Solution à y nM/ml $\longrightarrow$ $(D-T) \times$ degré fluorimétrique

$$. y = \frac{(D - T)}{x}$$

Résultat

$$\frac{y \times 10 \times 10}{60 \times \text{mg/ml créatinine}}$$

car : urine diluée à 1/10

0,1 ml d'urine utilisée

pour rendre le résultat en minutes (60 minutes d'incubation)

4) Comparaison des deux méthodes

La méthode fluorimétrique présente une sensibilité nettement supérieure. En effet, l'utilisation de la fluorescence émise par la méthylumbelliférone à pH = 10,3 permet de détecter des quantités très faibles de ce produit ce qui est un gros avantage sur l'appréciation spectrophotométrique du para nitro phénol.

2 - DOSAGE DE LA BETA-D-GLYCURONIDASE

DEFINITION DE L'ENZYME

L'appellation correcte est la bêta-D-glucuronide-glucuronosohydrolase, EC 3-2-1-31.

Elle entre dans le cadre des enzymes agissant sur les composés formés d'acide glycuronique et liés par une liaison osidique bêta à un substitut R.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La méthode utilisée est la méthode fluorimétrique dérivée de celle de SANDMAN et collaborateurs (90 A). Elle est semblable à la méthode de dosage de la N-acétyl-bêta-D-glucosaminidase. Le substitut est ici la 4-méthyl-umbelliféryl-bêta-D-glucuronide. La fluorescence de la méthyl-umbelliforme libérée est lue au fluorimètre.

L'activité enzymatique est ramenée en mg de créatinine urinaire et par minute d'hydrolyse.

3 - RESULTATS

Nous avons effectué des dosages chez 17 sujets normaux âgés de 20 à 60 ans.

Les valeurs obtenues exprimées en nanomoles/mg de créatinine/minute :

$$\begin{aligned} - \text{NAG} &= 0,86 \pm 0,53 \\ - \text{Gly} &= 0,23 \pm 0,16 \end{aligned}$$

Ces valeurs sont plus basses que celles obtenues par SANDMAN (90 A) :

$$\begin{aligned} - \text{NAG} &= 0,71 \text{ à } 3,1 \\ - \text{Gly} &= 0,1 \text{ à } 1 \end{aligned}$$

Il n'existe théoriquement pas de variations suivant l'âge et le sexe.

Cependant chez 5 témoins âgés de plus de 60 ans apparemment normaux, nous trouvons respectivement un taux moyen de $2,75 \pm 1,30$ et $0,72 \text{ nM (Gly)}$.

..../...

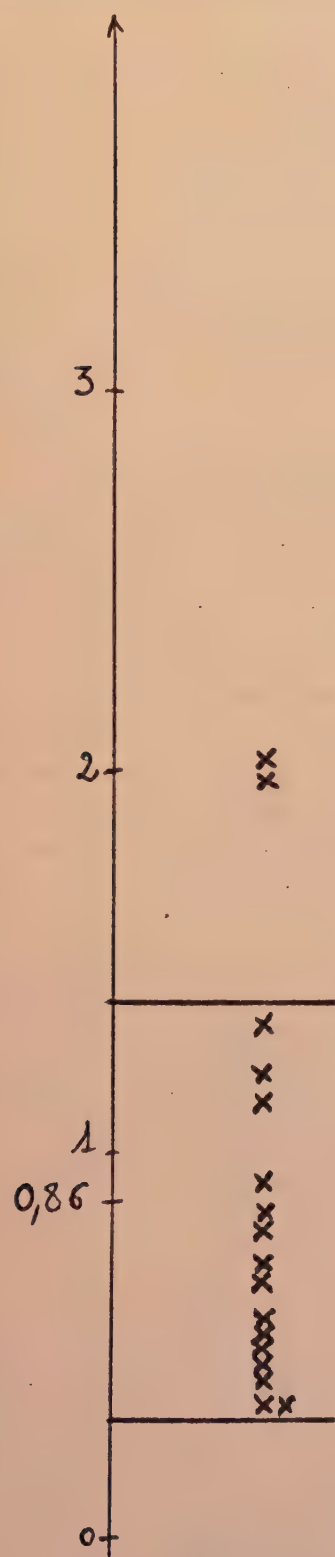
Nous avons effectué une série de dosages au cours de la journée chez 5 sujets normaux. Cette étude révèle un maximum d'élimination au cours de la nuit (de 20 heures à 8 heures) avec un maximum d'élimination à 24 heures. Mais nous n'avons pas trouvé d'autres études sur ces variations nycthémérales.

*

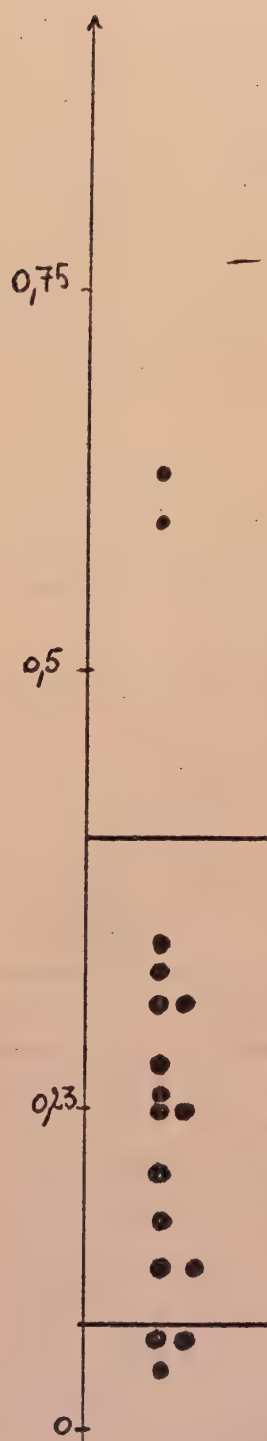
*

*

GLUCOSAMINIDASE

SUJETS TEMOINS

GLYCURONIDASE

TABLEAU A

4 - VARIATIONS EN PATHOLOGIE - REVUE GENERALE

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'élimination urinaire de N.A.G. et Gly.

AU COURS DES AFFECTIONS RENALES

Au cours de maladies rénales, DANCE et PRICE (19 B), WELLWOOD et coll. (103) notent une augmentation de l'excrétion. Ainsi, d'après WELLWOOD, le taux urinaire de N.A.G. serait nettement augmenté au cours des glomérulonéphrites aiguës, des syndromes néphrotiques. Si les taux restent élevés, il existe un risque de rechute.

Au cours des pyélonéphrites chroniques et des glomérulonéphrites chroniques, le taux de N.A.G. est augmenté avec la créatinine urinaire.

Au cours de l'insuffisance rénale aiguë après hypotension, l'augmentation de la N.A.G. est très franche alors que les taux d'urée et de créatinine sanguine ne sont pas modifiés.

WELLWOOD et coll. (103) estiment ainsi que la N.A.G. est un indicateur sensible de l'atteinte rénale et que ce test simple pourrait servir dans le bilan d'une atteinte rénale.

Ce dosage est parfois pratiqué dans la surveillance après greffe rénale : PRICE et coll. (80), WELLWOOD et coll. (104), SANDMAN et coll. (90 A). Ainsi, selon SANDMAN et coll., le dosage journalier de la N.A.G. peut être utilisé pour diagnostiquer l'atteinte rénale due au rejet et à l'ischémie après une greffe.

WELLWOOD et THOMPSON (105) estiment la néphrotoxicité rénale de certaines thérapeutiques par le dosage de la N.A.G. dans les urines.

La glycuronidase a été également étudiée dans les affections rénales et a été trouvée à un taux élevé dans une grande variété de maladies du rein et des voies urinaires : cancer de vessie, cystite. SCHAPIRO et coll. ont montré qu'elle constituait un indicateur de l'inflammation du parenchyme rénal.

AU COURS D'AFFECTIONS HEPATO-BILIAIRES

En cas de cirrhose il est noté une augmentation de l'activité sérique de la N.A.G. et OKASAKI (78) pense qu'il est vraisemblable que le taux enzymatique reflète le degré de fibrose hépatique.

Dans l'intoxication aigue éthylique, il est noté une élévation significative de la glycuronidase. L'élévation du taux sérique est probablement due, d'après GEOKAS (40), à l'augmentation de la perméabilité des membranes lysosomiales résultant de l'action de l'éthanol ou de ses métabolites.

Dans les hépatites aigues ou chroniques, il est rapporté également une augmentation de l'activité de la N.A.G. et de la glycuronidase (plus marquée pour la N.A.G.).

AU COURS DES ATTEINTES ARTICULAIRES

La décharge des enzymes lysosomiales est impliquée dans la pathogénie de l'inflammation chronique des désordres du tissu conjonctif, parmi lesquels la P.C.E. Cette affection donne d'après DIEPPE (21 B) les taux urinaires les plus élevés. L'activité enzymatique dans la membrane synoviale, le liquide synovial et le sérum de patients ayant une P.C.E. est également haute. MUIRDEN en 1972 (71) observe une corrélation entre le taux dans le liquide synovial et la destruction cartilagineuse. KAR et PEARSON (51) suggèrent qu'il existe une corrélation similaire entre le taux sérique et l'activité de la maladie.

Au cours de la goutte, il a été noté également une augmentation de l'activité sérique de la N.A.G. Cette augmentation est cependant moins franche que celle de la glycuronidase.

AU COURS DES COLLAGENOSSES

KAR et PEARSON ont rappelé les augmentations de la N.A.G. sérique au cours du LED, des polymyosites, dermatomyosites.

.../...

AU COURS DES MALADIES HEREDITAIRES DU TISSU CONJONCTIF

Chez les malades atteints de mucopolysaccharidoses type I et III il existe une augmentation de l'activité sérique de la N.A.G. et de la glycuronidase. Par contre, il existe une diminution de l'activité de la N.A.G. dans les fibroblastes de patients atteints de mucolipidose alors que le taux sérique est augmenté.

AU COURS DU DIABETE

Des équipes de fundamentalistes ont dosé la N.A.G. et la glycuronidase sériques au cours du diabète. Leur activité est augmentée. O'BRIEN (77). Une perturbation du métabolisme des glycoprotéines a été proposée comme facteur responsable des microangiopathies diabétiques (75 B).

AU COURS DE LA MUCOVISCIDOSE

GIBBS et GRIFFIN avaient suggéré que l'accumulation des M.P.S. dans les fibroblastes en culture provenant de biopsies cutanées d'enfants souffrant de mucoviscidose était due à un déficit en bêtaglycuronidase. KRAUSS et coll. ainsi que FILLAT et coll. (29) n'ont pas retrouvé de déficit en cette enzyme pouvant expliquer la métachromatie.

DANS LES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS

L'activité de la bêtaglycuronidase lymphocytaire est nulle ou très diminuée dans les leucémies lymphoïdes chroniques et la macroglobulinémie de WALDENSTROM (ZITTOUN : 107). Au cours des rémissions elle tend à se normaliser. Dans les lymphosarcomes et les leucémies à cellules lymphosarcomateuses, l'activité est souvent peu diminuée. Elle est normale dans les autres types de sarcome : réticulosarcome et maladie de Hodgkin.

Cette étude s'avère, d'après ZITTOUN, BOUSSER et coll. (107) aussi intéressante dans les syndromes lymphoprolifératifs que celle de la phosphatase alcaline des polynucléaires dans les maladies myéloprolifératives. Sa détermination serait utile pour distinguer les syndromes lymphoprolifératifs des lymphocytoses bénignes, mais a moins d'intérêt pour le diagnostic différentiel entre la L.L.C. et le lymphosarcome.

5 - ETUDES DES VARIATIONS DE L'ELIMINATION URINAIRE DE LA N.A.G. ET DE LA GLYCURONIDASE (nos travaux) (7 B)

Nous avons effectué plus de 300 dosages de ces enzymes dans des urines de malades hospitalisés à l'hôpital CHALUCET (TOULON). Nous avons éliminé les résultats de malades ayant une H.T.A., un diabète, une infection urinaire.

Nous nous sommes essentiellement intéressés aux malades souffrant d'affections hépato-biliaires, de métastases osseuses, d'atteinte articulaire (essentiellement au cours de la P.C.E.), de maladie de Paget.

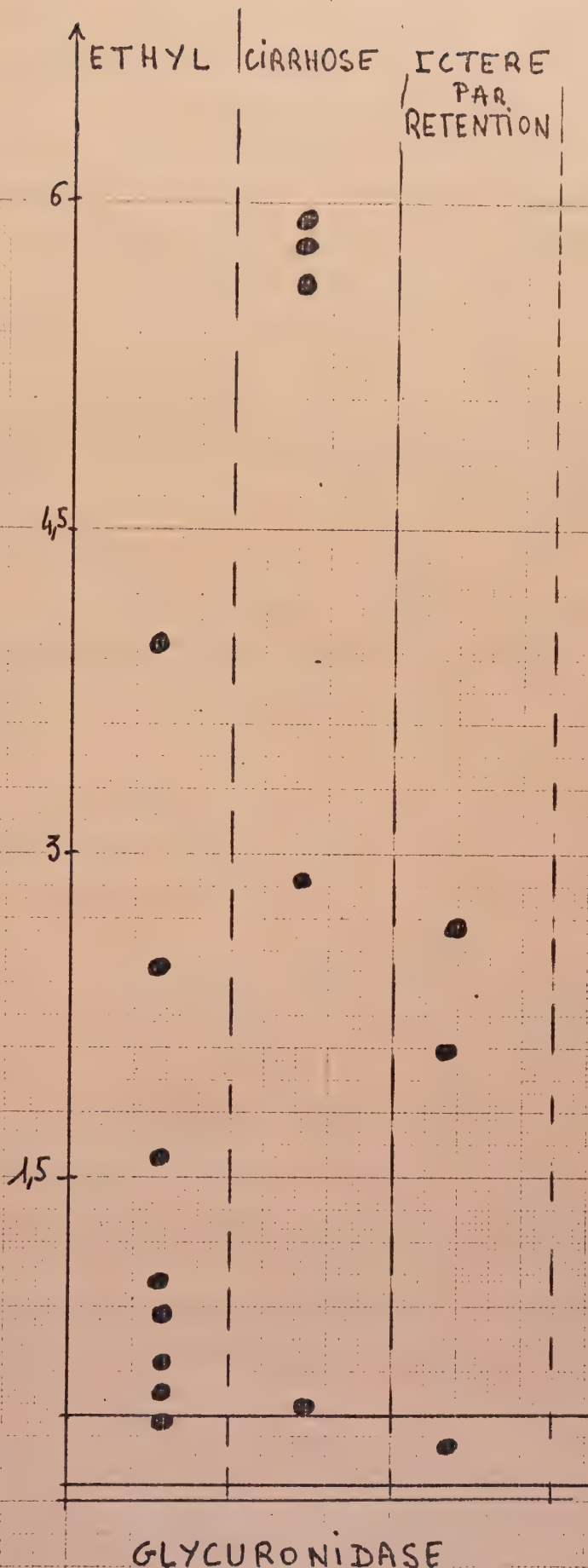
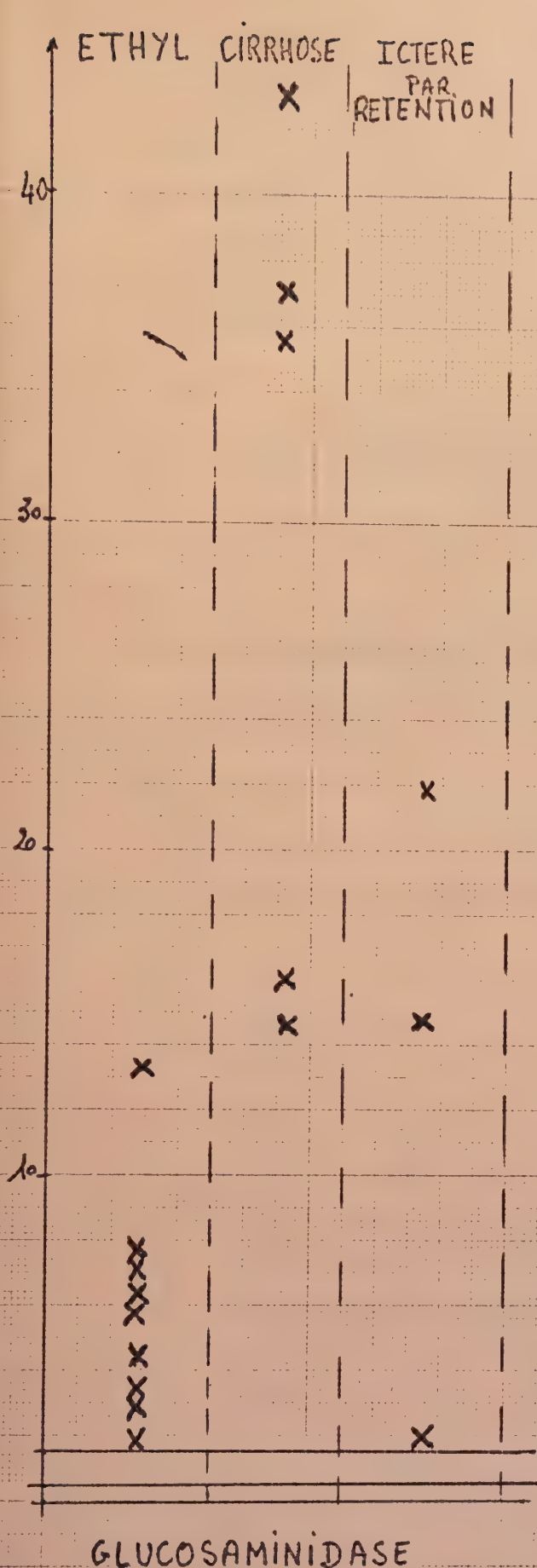
Au cours des affections hépato-biliaires, nous avons retrouvé les résultats donnés dans la littérature. TABLEAU I.

Chez les éthyliques, les taux étaient toujours supérieurs à la normale. Valeurs moyennes : N.A.G. = 5,68, Gly = 1,4.

Au cours des cirrhoses, les taux étaient nettement plus élevés. Les valeurs les plus fortes étaient obtenues au cours de décompensation oedemato-ascitique. Valeurs moyennes : N.A.G. = 29,2, Gly = 4,16. Dans ces cas, différents examens pratiqués étaient parallèles à l'évolution de la décompensation.

N.A.G. - Cas 1	:	37,06	-	37,13	-	12,01
Cas 2	:	20,56	-	35,51	-	43,58
Gly - Cas 1	:	4,18	-	5,65	-	3,53
Cas 2	:	2,86	-	5,90	-	13,75

Au cours de 3 ictères par rétention sur cancer de la tête du pancréas, les taux étaient aussi supérieurs à la normale : N.A.G. moyen = 12,67, Gly moyen = 1,65. Le taux subnormal correspondait au début de l'évolution. Ceci est parallèle aux résultats expérimentaux obtenus par RODRIGUEZ - GARAY qui montrent que l'activité de la bêta-glycuronidase dans le foie augmente 24 heures après ligature des voies biliaires et que cette enzyme passe ensuite dans le courant circulatoire avec un taux maximum le 5ème jour. Il existe, selon ces auteurs, un rapport entre la concentration enzymatique dans le sérum et la présence de pigments non conjugués dans la peau.



AFFECTIONS HEPATO-BILIAIRES.

TABEAU I

Mais nous nous sommes particulièrement intéressés à la pathologie articulaire. En effet, si de nombreux travaux ont été effectués sur l'étude du liquide synovial - signalant une augmentation de Gly et de N.A.G., ainsi que des phosphatases acides et de nombreuses autres enzymes - et leurs corrélations avec l'intensité des manifestations inflammatoires démontrées, seuls quelques articles ont été consacrés à la glycuronidase et à la N.A.G. urinaires.

Nous trouvons (TABLEAU II) une augmentation discrète au cours du lupus érythémateux (3 cas), de l'arthrose en poussée douloureuse (5 cas) (taux moyens : $4,2 \pm 2,5$ pour la N.A.G.), de la goutte (4 cas) surtout lors de poussée.

Mais ce phénomène est particulièrement significatif chez 15 polyarthrites rhumatoïdes. Le taux moyen est de 13,5 nM pour la N-acétyl-bêta-glucosaminidase avec un écart type de 8,9 et de 2,1 nM pour la bêta-glycuronidase.

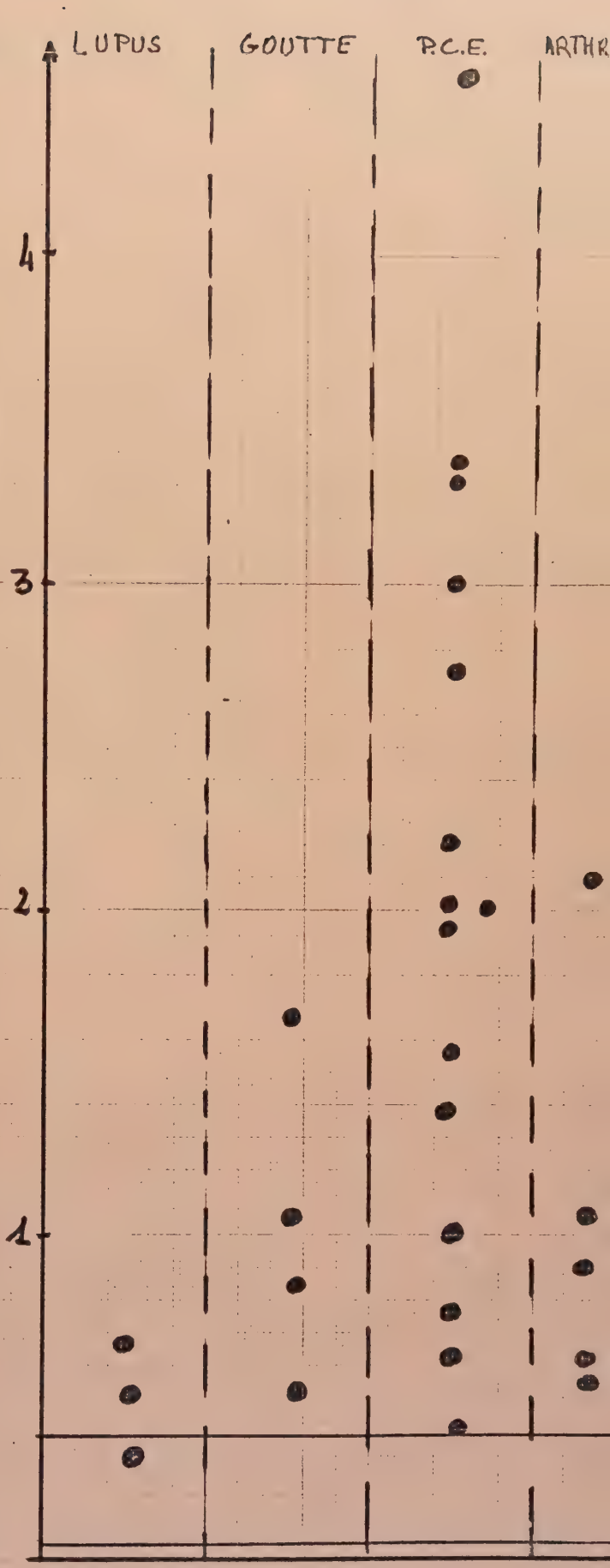
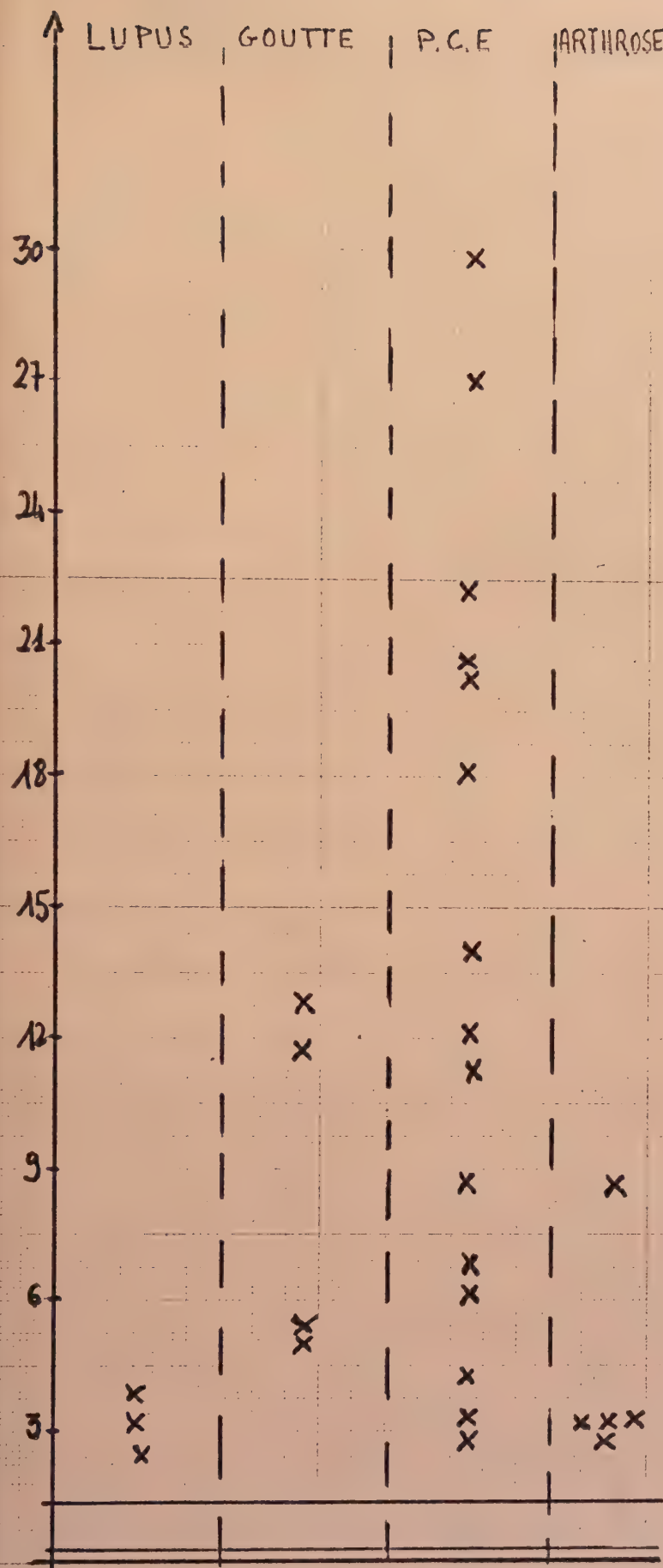
La corrélation entre la N.A.G. et la V.S. est très significative ($r = 0,73$, $P < 0,005$) alors qu'elle ne l'est pas pour la glycuronidase (TABLEAUX III et IV).

En ce qui concerne la pathologie osseuse nous n'avons pas trouvé d'études au cours de la maladie de Paget et lors de métastases osseuses.

Au cours des métastases osseuses (TABLEAU V) 5 cas sont rapportés. Les taux $17 \text{ nM} \pm 7,6$ (N.A.G.) et $2,8 \text{ nM}$ (Gly) sont élevés. Dans quatre cas il s'agissait de métastases de cancer pulmonaire. Dans le cinquième cas, le cancer primitif n'a pas été trouvé. Des dosages pratiqués chez des malades atteints de cancer pulmonaire sans métastases osseuses décelées montrent malheureusement des taux également élevés.

Cancer du poumon sans métastases osseuses décelées :

	<u>N.A.G.</u>	<u>Gly</u>
GOU	6,56	1,79
MAL	40,53	2,38
SCR	3,88	0,67



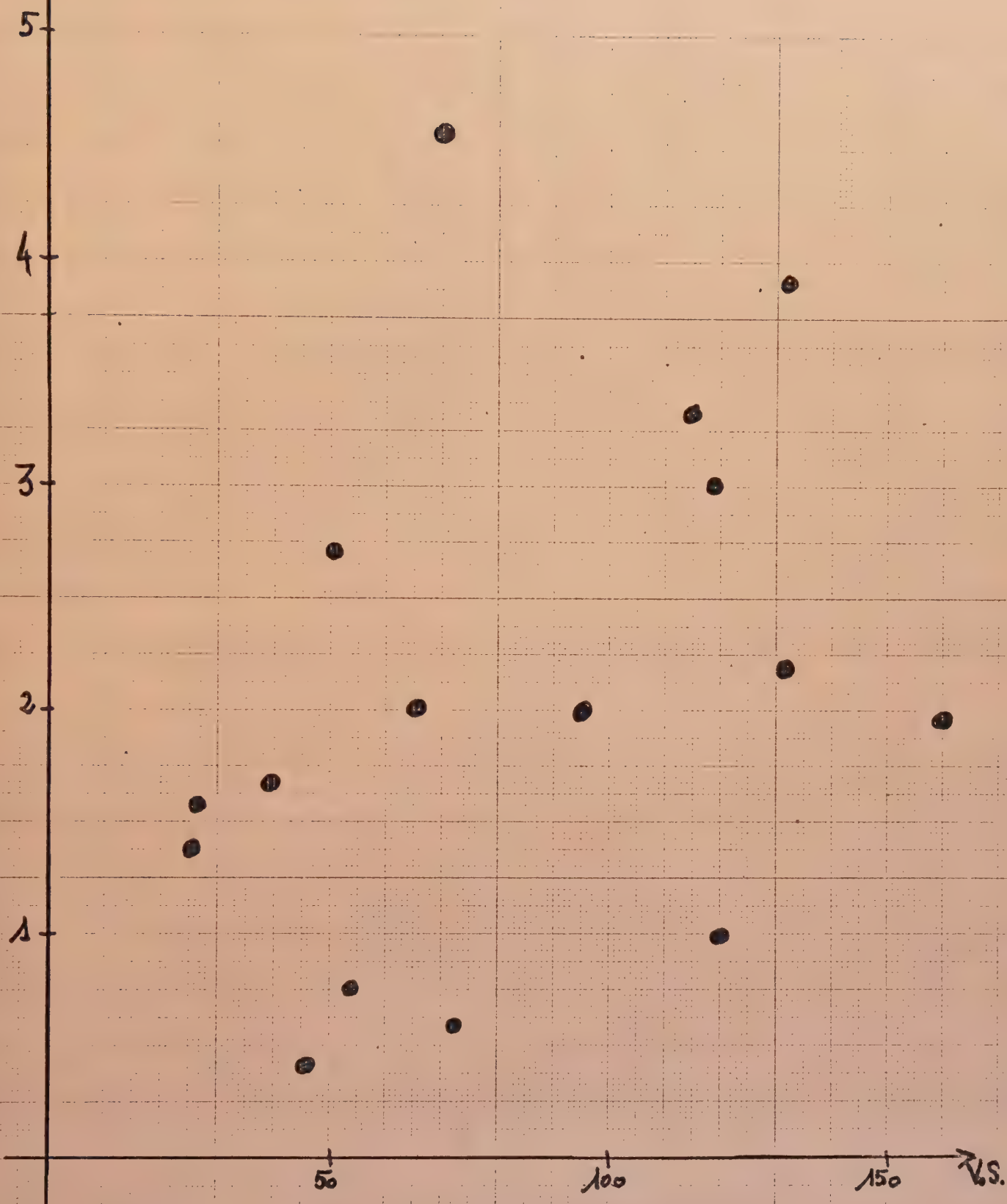
GLUCOSAMINIDASE

GLYCURONIDASE

PATHOLOGIE ARTICULAIRE

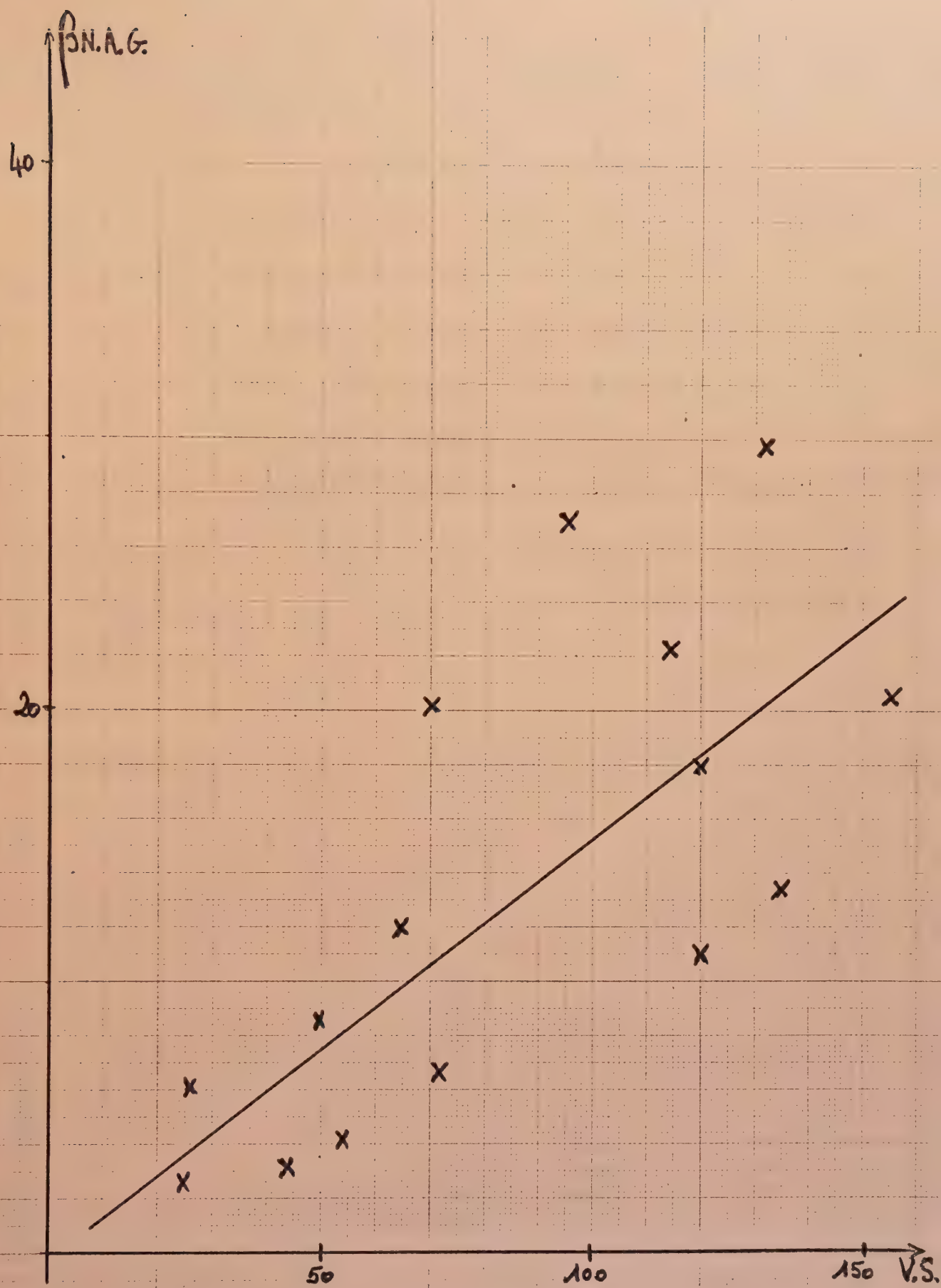
TABEAU II

Aglyuro



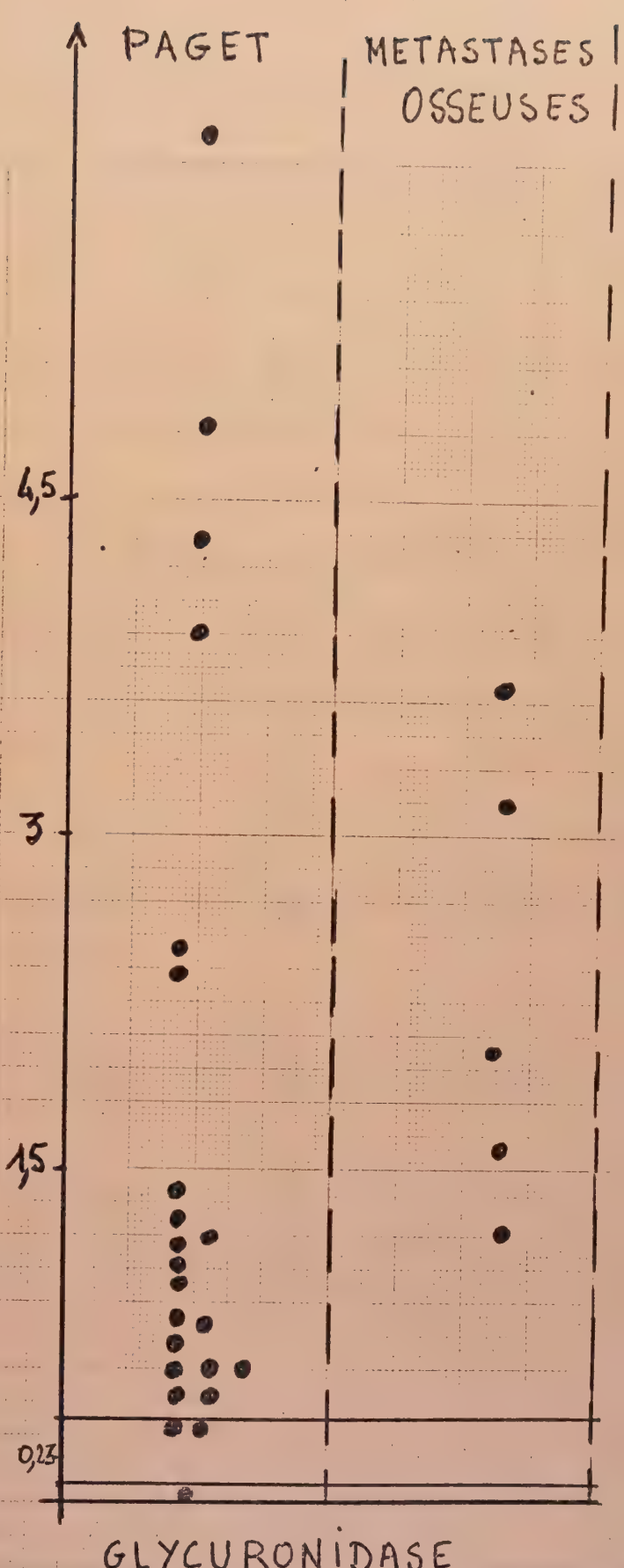
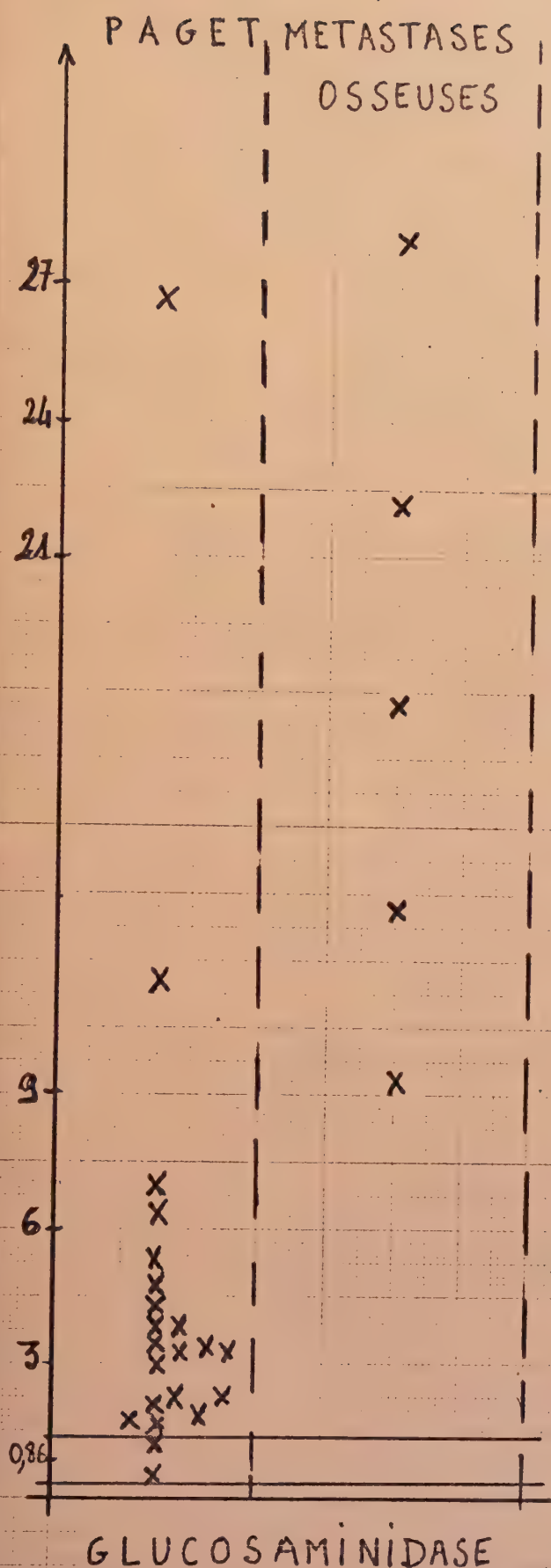
P.C.E.

TABLEAU III



P.C.E.

TABLEAU IV



PATHOLOGIE OSSEUSE

TABLEAU V

Nous avons dosé ces enzymes chez 22 malades souffrant de maladie de Paget d'étendue et d'évolutivité variables (TABLEAUX V et VI). Les taux moyens étaient de 5,1 nM (N.A.G.) et 2,5 nM (Gly). Mais il n'existe aucune corrélation avec les phosphatases alcalines ni avec l'hydroxyprolinurie.

6 - COMMENTAIRES

Le dosage de la N.A.G. et de la Glycosaminidase urinaires en pathologie osseuse ne présente pas, semble-t-il, un intérêt majeur.

Ces dosages demeurent un bon reflet de l'inflammation au cours des polyarthrites notamment mais l'interprétation de ces modifications reste difficile et nécessiterait d'autres travaux : dosage de l'activité sérique, séparation des isoenzymes, dosage intracellulaire, dosage couplé avec la mucopolysaccharidurie.

En effet, au cours de la P.C.E., il peut s'agir d'un reflet de l'atteinte cartilagineuse et de l'évolutivité de l'affection ou, comme le pense DIEPPE, de la conséquence d'une atteinte rénale ou même du traitement de la polyarthrite.

Nous étudions actuellement, dans le Service du Docteur EISINGER, l'activité sérique et l'évolution de ces paramètres sous traitements.

En conclusion, le dosage des enzymes lysosomiales urinaires et particulièrement de la N.A.G. peut être considéré comme une technique d'exploration intéressante au cours de la polyarthrite rhumatoïde.

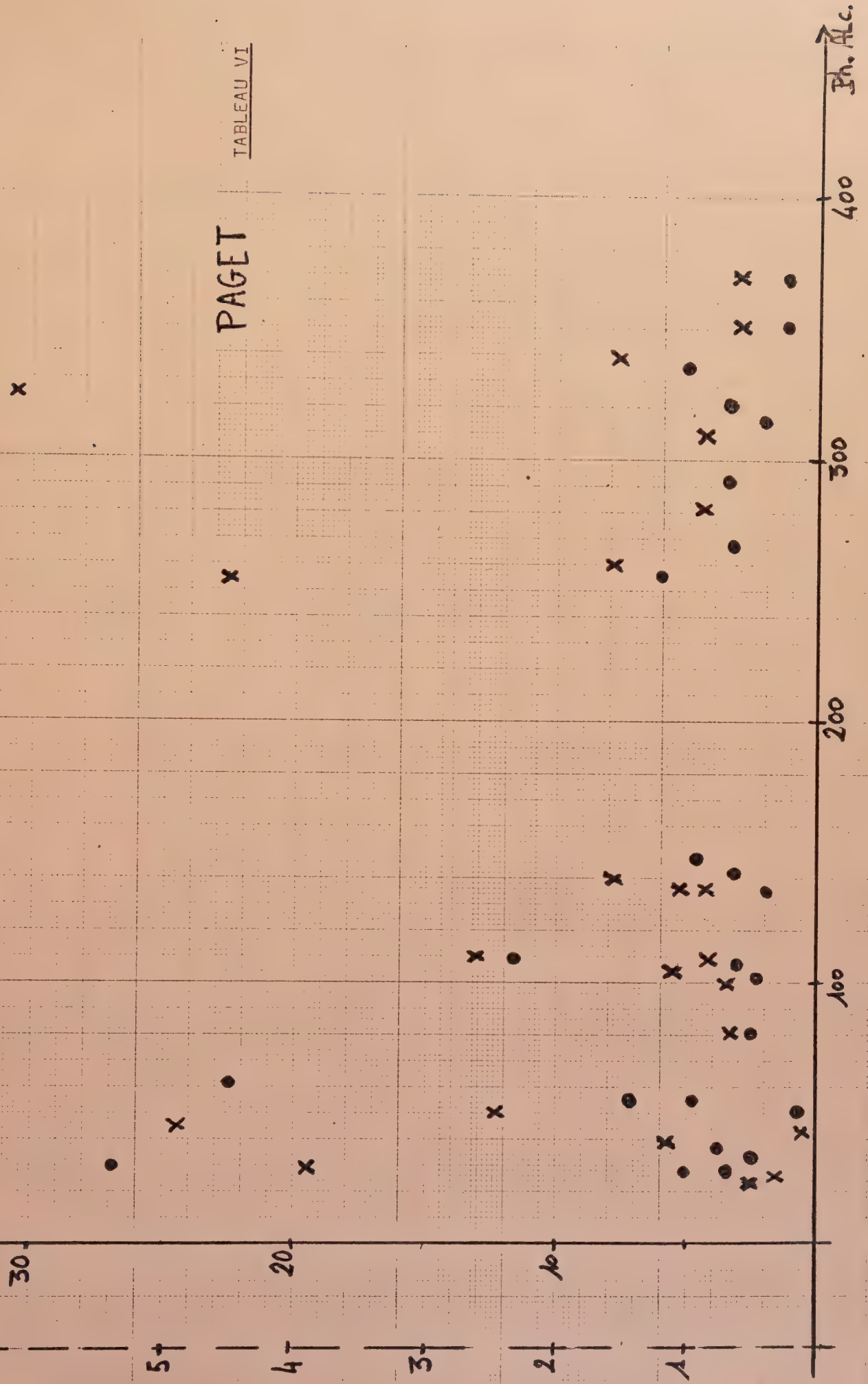
*

* *

β glucose
 β NAG

PAGET

TABLEAU VI



RESUME
=====

R E S U M E

=====

L'exploration biochimique du métabolisme de la matrice intercellulaire du tissu conjonctif bénéficie de nombreuses techniques. Elles permettent une approche plus fine des différents stades de la synthèse et de la dégradation des molécules essentielles, une meilleure connaissance de leurs interactions et de leur rôle dans la physiopathologie de diverses affections. Certaines ont un rôle important au niveau du diagnostic et de la surveillance thérapeutique.

L'étude du métabolisme des glycoprotéines de structure et de l'élastine n'est pas réalisable en pratique courante. Mais des équipes de chercheurs ces dernières années ont montré à leur sujet que la différenciation et la morphogénèse des tissus conjonctifs étaient la conséquence d'une régulation précise de la vitesse relative de synthèse des matériaux constitutifs. Ils ont mis en évidence les relations élastine-lipides, les mécanismes de l'apparition des dépôts calcaires dans les artères; ils envisagent l'importance probable des facteurs immuns anti-élastine, des élastases. Ainsi est permise une approche pathogénétique du vieillissement et de l'artériosclérose au niveau moléculaire.

L'étude de la synthèse des glycosaminoglycanes par l'incorporation de produits radioactifs dans des cultures cellulaires permet aussi une meilleure connaissance des altérations vasculaires. Ce type d'étude autorise par ailleurs le diagnostic des mucopolysaccharidoses, ainsi que la détermination du type de déficit enzymatique responsable. Mais ces affections sont, de façon courante, diagnostiquées par l'étude de la mucopolysaccharidurie. Un diagnostic anténatal est possible par l'étude des cellules et du liquide amniotique.

L'étude des enzymes lysosomiales de dégradation est encore peu réalisée. Notre travail sur la bêta-glucosaminidase dans les urines semblerait montrer une augmentation du taux dans la P.C.E. et une corrélation significative avec l'évolutivité de la maladie. Les autres résultats en pathologie osseuse semblent décevants. Au cours des affections hépato-biliaires, nous retrouvons les données de la littérature.

.../...

Il existe de nombreuses techniques d'étude du métabolisme du collagène.

In vitro, par incubation dans des cultures de fibroblastes d'acides aminés marqués (essentiellement proline marquée et glycine marquée) est possible une étude quantitative de la synthèse du collagène, avec étude de l'aptitude d'un tissu à synthétiser du collagène soluble et insoluble, une étude dynamique de l'influence de certains facteurs.

Par ces techniques il a été expliqué les épaissements des membranes basales des capillaires des diabétiques : ils proviendraient d'une augmentation de la synthèse du collagène et des glycoprotéines de structure; de telles recherches permettraient la détection précoce du diabète.

Les différentes étapes de la biosynthèse du collagène sont maintenant bien connues et peuvent être explorées :

- les hydroxylations par l'étude des enzymes : lysyl-hydroxylase et proline-hydroxylase
- les glycosylations par l'étude des glucosyltransférases dont l'importance est croissante en biologie et en pathologie
- la désamination oxydative, au cours de la phase extrafibroblastique, précédant la formation des pontages intermoléculaires, par le dosage de l'activité de la lysine oxydase
- étude du pontage par le rapport $\frac{\text{collagène soluble}}{\text{collagène insoluble}}$

La dégradation du collagène est mal connue. Une enzyme qui intervient à ce niveau est facilement dosable : la proline-imino-peptidase. Des travaux ultérieurs permettront de montrer si son dosage reflète d'une manière plus précise que les études pratiquées actuellement le catabolisme de cette glycoprotéine. Ces études concernent la proline, l'hydroxylysine et surtout l'hydroxyproline. Ces acides aminés sont, à des degrés divers, spécifiques du collagène.

Le dosage de l'hydroxylysine (dont le taux dans les urines est indépendant du régime alimentaire) est encore peu pratiqué. Les glycosides de l'hydroxylysine montreraient l'origine de la dégradation du collagène (os, peau).

L'hydroxyproline est un acide aminé contenu essentiellement dans le collagène. Son étude donne un reflet du métabolisme de cette protéine fibreuse. Elle est maintenant de pratique courante. Elle nécessite un contrôle diététique au cours du dosage qui se pratique dans les urines plutôt que dans le sang. Il semble qu'il soit préférable de rapporter le taux d'hydroxyprolinurie à la créatininurie et que les variations éventuelles s'atténuent si on pratique le dosage sur des urines de 48 heures.

L'hydroxyprolinurie est augmentée parallèlement à l'augmentation de la dégradation du collagène soluble, de la synthèse du collagène, de la dégradation du collagène insoluble. Pour avoir des modifications de l'excrétion urinaire, il faut une importante modification métabolique. Les valeurs pathologiques de l'élimination urinaire de l'hydroxyproline ne sont pas spécifiques mais l'histoire clinique, les symptômes et le reste du bilan biologique habituel permettent d'identifier les conditions relativement rares qui en sont responsables. Les peptides contenant de l'hydroxyproline sont différenciés en hypropeptides non dialysables et hypropeptides dialysables; les premiers reflètent la formation du collagène osseux.

*

* *

CONCLUSION

=====

C O N C L U S I O N

=====

La connaissance du métabolisme des constituants du tissu conjonctif est beaucoup plus précise depuis ces dernières années.

Au cours de ce travail, qui ne peut constituer qu'un point de départ, nous avons essayé de montrer que, parmi les différentes techniques utilisées dans son étude, certaines semblent particulièrement importantes car situées à des étapes clefs : dosage de la lysine-hydroxylase et de la proline-hydroxylase, étude des glucosyltransférases, dosage de la lysine oxydase, dosage de l'élastase, culture de cellules en présence de précurseurs marqués. Mais ces techniques ne sont utilisées que par les équipes de chercheurs.

Par contre, des techniques sont couramment utilisées et permettent l'étude des glycosaminoglycanes et du collagène : dosage de la mucopolysaccharidurie dans la détection des mucopolysaccharidoses, dosage de l'hydroxyproline urinaire (préférentiellement sur 48 heures et rapportée à la créatininurie) intéressante essentiellement dans les maladies osseuses métaboliques comme la maladie de Paget, l'ostéomalacie, le myélome multiple et dans certaines maladies endocriniennes : acromégalie, hyperthyroïdie, hyperparathyroïdie. Dans le cadre de l'étude du catabolisme du collagène, la proline-imino-peptidase (P.I.P.) nous paraît particulièrement intéressante.

Le travail que nous avons effectué sur le dosage de la N-acétyl-bêta-glucosaminidase et de la glycuronidase dans les urines d'un groupe de 300 malades nous a permis de retrouver certaines données de la littérature dans le cadre des affections hépato-biliaires, et surtout, de conclure d'une part à l'intérêt du dosage de la glucosaminidase dans l'étude des P.C.E. et, d'autre part, à son manque d'intérêt dans le cadre de la maladie de Paget et des métastases osseuses.

.../...

Les différentes phases de la synthèse, de la dégradation et l'inter-relation des molécules du tissu conjonctif peuvent donc être étudiées. Ainsi a-t-il été possible de caractériser sur le plan biochimique les maladies d'origine génétique ou acquises qui affectent chaque étape.

Des maladies relativement rares bénéficient ainsi d'une meilleure connaissance de leur physiopathologie. Mais ces techniques permettent aussi de nouvelles interprétations d'affections telles que l'artériosclérose, les maladies du vieillissement, le diabète. Ainsi "est-il permis d'espérer une meilleure compréhension et une approche plus rationnelle pour le diagnostic et la thérapeutique de ces affections." (ROBERT L.) (86)

Le Président de la Thèse

M. PLAUCHU

Vu, le Directeur de l'U.E.R. Sud-Ouest

J. NORMAND

Vu et Permis d'Imprimer

LYON, le 3 Février 1977

Le Président de l'Université Claude Bernard
Président du Comité de Coordination des
Etudes Médicales

D. GERMAIN

BIBLIOGRAPHIE
=====

BIBLIOGRAPHIE

1 - ADAM et coll. :

Collagen in rheumatoid arthritis
Clin Chim Acta 70 (1976) 61-69

2 A - ALLALOUF et BEV :

B.B.A. 201 (1970) 61

2 B - ALLARD J.P. :

Hydroxyproline urinaire
Arch. Méd. de Norm. Février 1975

3 - ALMAS BEGUM :

Urinary excretion of bêta-glucuronidase in protein-calorie malnutrition
Clin Chim Acta 46 (1973) 229-234

4 - AMIR E., OBERMAN Z., LAURIAN L., HERZBERG H. :

Hydroxyproline excretion as an assessment of response to treatment with anabolic drugs
Isr. J. Med. Sci. Vol. 11 p. 1226

5 - ANASUYA A., RAO N. 1974 :

Hydroxyproline peptides of urine in fluorosis
Clin. Chim. Acta, 1974, 56, 121-123

6 - ANTTINEN :

Assay of protocollagen lysyl-hydroxylase activity in the skin of human subjects and changes in the activity with age
Clin. Chim. Acta, 47 (1973) 289-294

7 A - ASKENASI :

Contribution of Kidney Basement Membranes and Collagen to the Urinary Excretion of Hydroxyllysyl Glycosides

Biomédecine Mai 1975. Volume 22 n° 3 - 233-237

7 B - AYAVOUX T., LAMOULERE J.M., EISINGER J. :

Dosages de la N-acétyl-bêta-D-glucosaminidase et bêta-D-glycuronidase urinaire
Communication Soc. Méd. Chir. MARSEILLE
MARSEILLE Médical. A paraître

8 - BACH, FRIEDMAN, WEISSMAN, NEUFELD :

The defect in the HURLER and SCHEÏE syndromes : deficiency of alpha-iduronidase
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 1972, 69, 2048-2051

9 - BAILEY J.A. :

Tissue and species specificity in the crosslinking of collagen
Patho bio, Oct. 74, 8, 675-680

10-11 - BAILEY J.H. :

Stabilisation des fibres de collagène et relations possibles avec
les maladies héréditaires du tissu conjonctif
Cahiers Méd. Lyonnais Mars 1975 p. 383-6

12 - BERENSON, DALFERES et coll. :

B.B.A. 101 (1965) 183

13 - BERNARD A. :

Hydroxyproline
Thèse en Médecine - MARSEILLE 1976

14 A - BERRY et SPINANGER :

J. Lab. Clin. Méd. 1960, 55, 136

14 B - BLUMENKRANTZ, ROSENBLOOM, PROCKOP :

Sequential steps in the synthesis of hydroxylysine an the glyco-
sylation of hydroxylysine during the biosynthesis of collagen
B.B.A. 1969, 192 p. 81-89

15 - BOULANGER P., PLAQUET R., BISERTE G. 1960 :

Acides aminés et polypeptides des milieux biologiques.VIII.
Formes combinées de proline, d'hydroxyproline et de glycocolle
de l'urine humaine
Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42, 393-406

16 - BOURRILLON R., VERNAY H. 1966 :

Deux glycopeptides à hydroxyproline dans l'urine humaine normale
Biochim. Biophys. Acta 1966, 117, 319-330

17 - CALCOTT M.A. et MULLER-EBERHARD H.J. :

Biochem. 18 3443 (1972)

18 A - CHERIAN M.G., RADHAKRISHNAN A.N. 1966 :

Isolation and characterization of a new glycopeptide containing
hydroxyproline from human urine
Indian J. Biochem. Biophys. 1966, 3, 101-105

18 B - CLIVE R., HAMLIN, KOHN, LUSCHIN :

Apparent accelerated aging of human collagen in Diabetes mellitus
Diabetes Vol. 24 n° 10 p. 902-904

19 A - COURVOISIER B. et ZENDER R. :

Etude de l'hydroxyprolinurie dans les affections du squelette :
ses corrélations avec les autres paramètres du métabolisme osseux
Schweiz. Med. Wschr. 102, 160-166 (1972)

19 B - DANCE N., PRICE et coll. :

The excretion of N-acetyl-bêtaglucosaminidase and bêta-galacto-
sidase by patients with renal Disease
Clin. Chim. Acta 27, 87, 1970

20 - DAVRIL M., MOSCHETTO Y., HAN K.K. :

Hétérogénéité dans la répartition des pontages de l'élastine.
Isolément de polypeptides à taux de réticulation élevée
Patho. Bio. Oct. 74 n° 8 p. 695-700

21 A - DECKERS :

Etude biochimique du syndrome de Marfan
Presse médicale 1971, 79 p. 1639

21 B - DIEPPE P.A. :

The use of bêta-N-acetyl-glucosaminidase excretion to investigate renal disease in rheumatoid arthritis
Rheumato. Rehabil 14 (4) 226, 30 Novembre 75

22 A - DI FERRANTE et RICH :

The M.P.S. of normal human urine
Clin. Chim. Acta, 1956, 1, 519

22 B - DI FERRANTE et RICH :

J. Lab. Clin. Méd. 48 (1970) 476

23 - DI FERRANTE N., ALMAZAN A. et coll. :

Lysyl oxidase deficiency in EHLERS-DANLOS Syndrome type V
Connective tissue Research 1975, Vol. 3, 49-53

24 - DREYFUS J.C., POENARU L. :

Déficits enzymatiques détectés sur fibroblastes et cellules amniotiques en culture
Ann. Biol. Clin. 1975, 33, 465-472

25 - EISINGER J.B. :

Hydroxyprolinurie
Thèse en Médecine - 1967 MARSEILLE

26 A - EISINGER J.B. :

Revue du rhumatisme 40 n° 6, 457, 1973

26 B - EISINGER J.B., LAPONCHE A.M., RECORDIER A.M. :

Hydroxyproline au cours des ostéoporoses
LYON Médical 1971, 10, 843

26 C - EISINGER J.B., LAPONCHE A.M., ROUX H., RECORDIER A.M. :

Exploration biologique de la maladie de Paget
Revue du rhumatisme 1976, 43 (2), 105-111

27 A - EISINGER F. et EISINGER J.B. :

L'hydroxyproline au cours de la maladie de Paget. Etude statistique
MARSEILLE Médical 1975, n° 6

27 B - FIENMAN - LIEBER 1972 :

Hepatic collagen metabolism : effect of alcohol consumption in rats and baboons
Science 176, 795

28 - FIGURA et KRESSE :

The Sanfilippo B corrective factor : a N-acetyl-alpha-D-glucosaminidase
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972, 48, 262-269

29 - FILLIAT, ROMARIE, TALLENT, HARTEMANN :

Détermination de l'activité de la bêta-glucuronidase dans les cultures de fibroblastes chez des enfants atteints de mucoviscidose
Patho. Biol. 21, 1, 13-16, 1973

30 - FONTAINE et coll. :

Elastine aortique
Patho. Bio. Janvier 1970, 1, p. 69-76

31 - FARJANEL J., RONZIERE M.C., RATTNER A., FREY J. :

Etude de l'action du calcium sur l'étape du métabolisme du collagène catalysée par la procollagène - proline - hydroxylase
Biochimie 58 n° 3, 1976, p. 333

32 - FARJANEL J., RONZIERE M.C., FREY J., RATTNER A. :

Etude de l'action du calcium sur l'étape du métabolisme du collagène catalysée par la procollagène - proline-hydroxylase
Biochimie n° 3, 1976, p. 333

33 - FREZET P.

Thèse de Doctorat en Médecine - MARSEILLE

34 - FRATANTONI, NEUFELD, UHLENDORF, JACOBSON :

Intrauterine diagnostic of the Hurler and Hunter syndromes
New. Eug. J. Med. 280, 686, 169

35-36 - FREY et coll. :

Etude in vitro de la biosynthèse et de l'incorporation de l'hydroxyproline dans le collagène soluble et insoluble des tissus hépatiques, aortiques et cutanés
Bulletin de la Société de Chimie Biologique 1969, n° 3, p. 471-479

37 - FREY J., FARJANEL J., PRUNIERAS M. et coll. :

Recherche des caractères fonctionnels des cellules fibroblastiques en culture : la synthèse et la sécrétion du collagène
Colloques de l'INSERM. Juin 1973, Vol. 19, p. 35-46

38 - FREY J., FARJANEL J., HELFRE G. :

Exploration du métabolisme du collagène
LYON Médical 1971, 226, 13, 17-24

39 - FULLER - LANGNER 1970 :

Elevation of proline-hydroxylase a biochemical defect in experimental arteriosclerosis
Science, 168, 987-989

40 - GEOKAS :

Plasma arylsulfatase and bêta-glucuronidase in acute alcoholism
Clin. Chim. Acta 46 (1973), 27-32

41 A - GOLDBER et COTLIER :

Specific isolation and analysis of mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) from human urine
Clin. Chim. Acta 41 (1972) 19-27

41 B - GOVERBE B.C. :

Un nouveau dosage spécifique de l'hydroxyproline urinaire reposant sur une hydrolyse catalysée par résine
Labo. de recherches
N.V. Organon. oss. (Pays-Bas)

41 C - GOBERBE B.C. et VEENKAMP J.N. :

Dosage de routine de l'hydroxyproline urinaire totale reposant sur une hydrolyse catalysée par résine
Clin. Chim. Acta 1972, 41, 29-40

42 - HADDAD J.G., COURANZ S., AVIOLI L.V. 1970 :

Non dialyzable urinary hydroxyproline as an index of bone collagen formation
J. Clin Endocrinal Metab. 1970, 30, 282-287

43 - HALL D.A., SLATER R.S. et TESAL I.S. :

The use of elastolytic enzymes as probes in the study of ageing in aortic tissue
in "Connective tissue and ageing" 1972
Workshop Conference Hoechst Vol. 1

44 - HARRIS E.D. :

Cooper-induced activation of aortic lysyl oxidase in vivo
Proc. Nat. Acad. Sci. 73 (1976) 371-74

45 - HAUSS W.H. :

Influence de la réaction du mésenchyme sur la teneur, la synthèse et le transport des lipides dans la paroi des artères
Patho. Bio n° 8, Déc. 1974, p. 651-661

46 A - HAYAKAWA, NAGATSU et coll. :

Lysyl oxidase activity in human normal skins and postburn scars
Clin. Chim. Acta 71 (1976) 245-250

46 B - HUMBEL R. :

Méthodologie d'étude des glycosaminoglycanes urinaires
Minerva Pediatrica 27, 1975, 475-7

- 47 - HUTTON, TAPPEL, UDENFRIEND 1966 :
A rapid assay for collagen proline hydroxylase
Anal Biochem. 16, 384-394
- 48 - JACOTOT B. :
Cholestérol et trame conjonctive de la paroi artérielle
Patho. Bio. n° 8, Déc. 1974, 707-713
- 49 - JUDD J.T. et WEXLER B.C. :
Prolyl hydroxylase and collagen metabolism after experimental myocardial infarction
Am. Journal of Physio. 228, 1, 212-216, 1975
- 50 - KAR N.C. and PEARSON C.M. :
Raised beta-acetylglucosaminidase in connective tissue disorders : an index of inflammation?
Lancet, i, 1456, 1973
- 51 - KAR N.C., PEARSON C.M. :
Elevated levels of serum bêta-acetylglucosaminidase in some patients with rheumatoid arthritis
Proc. Exp. Biol. Med. 142, 398, 1973
- 52 A - KASUYA I., KOSUGI H.A. 1967 :
A comparative study of a cyclic hydroxyprolyl peptide "so called hydroxyproline peptide" excreted in urine of a newborn infant and a similar peptide obtained from the protein of the umbilical cord
St. Paul's Rev. Sci. 1967, 2, 191, 196
- 52 B - KEISER H., LEROY E.C., UDENFRIEND S., SJOERDSMA A. :
Science 1963, 142-168
- 53 - KERN P. :
Matrices extracellulaires dans le diabète
Ann. Méd. REIMS 1976, 13, 2-3, 109-111
- 54 - KIBRICK A.D., BIEMENSTOCK H., 1969 :
Urinary excretion of prolylhydroxyproline in rheumatic diseases
Ann. rheum. Dis., 1969, 28, 28-30
- 55 - KIVIRIKKO et coll. :
Protocollagen proline-hydroxylase : molecular weight, subunits and isoelectric point
Bioch. Bioph. Acta. 221, 559-565
- 56 - KRANE S.M., MUNOZ, HARRIS E.D., 1967 :
Collagen like fragments : excretion in urine of patients with Paget's disease of bone
Science, 1967, 157, 713-716
- 57 A - LAITINEN O., 1975 :
Clinical applications of urinary hydroxyproline determination
Acta. Med. Scand. (suppl.) 577, 1-57

- 57 B - LAURENT R. et HENRY J.C. :
Signification et valeur diagnostique de l'élimination urinaire
de l'hydroxyproline
J. de Méd. de BESANCON 6, 1970, p. 117-141
- 58 - LEGRAND Y., ROBERT B. et L. et coll. :
Studies on a human blood platelet protease with elastolytic ac-
tivity
Biochim. Biophys. Acta 309, 406-413
- 59 - LINKER - TERRY :
Proc. Soc. Exp. Bio. Méd. 113
- 60 - LOUISOT P. :
Mucopolysaccharides et glycoprotéines du tissu conjonctif
LYON Médical 1971, 226, 13, 33-48
- 61 - LOUISOT P., RICHARD M., GATEAU O. :
Les glycosyltransférases. Importance biologique et pathologique
Ann. Biol. Clin. 1976, 34, 243-253
- 62 - LOUISOT P. :
Biosynthèse du collagène
LYON Médical 1971, 225, 9, 803-813
- 63 - MAC KUSICK :
Heritable disorders of connective tissue
4ème édition 1972
- 64 - MARKS J., SHUSTER S., 1968 :
Iron metabolism in skin disease.
Arch. Derm. 98, 469-475
- 65 - MAROTEAUX :
Maladies osseuses de l'enfant
Flammarion 1974, p. 246-268
- 66 - MATALON R., DORFMAN, NADLER, JACOBSON :
A chemical method for the antenatal diagnosis of mucopolysac-
charidoses
Lancet 1, 83, 1970
- 67 - MEILMAN E., URIVETZKY, RAPOPORT :
Urinary hydroxyproline peptides
J. Clin. Invest. 1963, 42, 40-46
- 68 - MEUNIER P. :
La maladie osseuse de Paget
Histologie quantitative, histopathogénie et perspectives thé-
rapeutiques
LYON Méd. 1975, 233, 8, 839-853

69 - MEZEY et coll. :

Hepatic collagen proline hydroxylase activity in alcoholic liver disease
Clin. Chim. Acta 68 (1976), 313-320

70 - MOCZAR M., ROBERT L. et coll. :

Structural and biochemical alterations of human diabetic dermis studied by ³H-lysine incorporation and microscopy
Path. Biol. 24, n° 5, 329-336, 1976

71 - MUIRDEN et coll. :

Ann. Rheum. Dis 1972, 31, 265

72 - MURATA :

Clin. Chim. Acta, 28 (1970) 213.

73 - MUSSINI, HUTTON, UDENFRIEND, 1967 :

Collagen proline hydroxylase in wound healing, granuloma formation, scurvy and growth
Science 157, 927-929

74 - NEUFELD - FRATANTONI :

Inborn errors of mucopolysaccharide metabolism
Science, 1970, 169, 141-146

75 - NEUFELD, LIM, SHAPIRO :

Inherited disorders of lysosomal metabolism
Ann. Rev. of biochem., 1975, vol. 44, p. 356-376

75 B - NIEBES :

Clin. Chim. Acta, 1972, 42, 399

76 A - NUSGENS B. et LAPIERE CH. M. :

The relationship between proline and hydroxyproline urinary excretion in human as an index of collagen catabolism
Clin. Chim. Acta 48 (1973), 203-211

76 B - NUSGENS B. et LAPIERE C.M. :

La mesure de l'hydroxyproline urinaire dans l'estimation du catabolisme des tissus conjonctifs
Revue méd. de LIEGE, 1974, 24, 767-9

77 - O'BRIEN et coll. :

New Engl. J. Med., 1970, 283, 15

78 - OKAZAKI :

Studies on serum N-acetyl- β -hexosaminidase activity in the liver diseases. Procedure and normal value
Jap. arch. intern. med., 1974, 21/2, 43/51

79 - PEYRON J.G. :

Biochimie du collagène et appareil locomoteur. Maladies héréditaires du tissu conjonctif et affections rhumatologiques
Revue du Rhum., 1977, 44 (1), 67-72

80 - PRICE, DANCE et coll. :

Clin. Chim. Acta. 1970, 27, 65

81 - REID :

K.B.M. 1974. Biochem. J., 189-203

82 - ROBERT L. et B., MOCZAR M. et E. :

Glycoprotéines de structure du tissu conjonctif
Patho. Bio. 1972, 20, n° 23-24, 1001-1012

83 - ROBERT B. et L., KADAR :

Etude biochimique et électromicroscopique des microfibrilles du tissu conjonctif
Patho. Biologie 1973, 21 suppl., 80-88

84 - ROBERT B., L. et A.M. :

Elastine, élastase et artériosclérose
Patho. Bio. Oct. 74, n° 8, p. 661-669

85 - ROBERT L. et B., KADAR A. :

Etude biochimique et électromicroscopique des microfibrilles du tissu conjonctif
Patho. Bio. 21 suppl., 1973, 80-88

86 - ROBERT L. :

Morphologie moléculaire du tissu conjonctif
Ann. Méd. REIMS, 1976, 13, 2-3, 57-61

87 - ROBINSON - STIRLING :

N-acetyl-bêta-glucosaminidases in human spleen
Biochem. J., 1968, 107, 321

88 - RODRIGUEZ, GARAY, SPETALE, MORISOLI :

Relationship between bilirubin and bêta-glucuronidase activity in rats with experimental obstructive jaundice
Clin. Chim. Acta. 37 (1972), 171-177

89 - ROSENFELD :

Clin. Chim. Acta. 31 (1971), 263

90 A - SANDMAN R., MARGULES R.M., KOUNTZ S.L. :

Glucosidases lysosomiales urinaires après transplantation rénale : corrélation de l'excrétion de l'enzyme avec le rejet de greffe et l'ischémie
Clin. Chim. Acta. 45, 1973, 349-359

90 B - SCHLOSS :

Détermination des sucres aminés par la méthode d'ELSON-MORGAN modifiée

Anal. Chem., 1951, 23, 1321

90 C - SCOTT J.E., NEWTON J. :

The recovery and characterization of acid glycosaminoglycans in normal human urine

Connective tissue Research, 1975, 3, 157-164

91 A - STEIN, KEISER, SJOERDSMA 1970 :

Proline-hydroxylase activity in Human Blood

Lancet 1970, 106-109

91 B - SZYMANOWICZ A., MALGRAS A., COSSON R., RANDOUX A., BOREL J.P. :

A Column chromatography fractionation of the hydroxyproline - containing urinary peptides with continuous automatic detections

Ann. Biol. Clin. 1975, 33, 351-8

92 - TELLER :

J. Labo. Clin. Med. 59 (1962), 95

93 - THOMAS, TAYLOR et coll. :

Analyses of N-acetyl- β -D-glucosaminidase in mucopolidosis II (I cell disease)

Clin. Chim. Acta. 45 (1973), 243-248

94 - TRNAVSKY K., TRNAVSKA Z. :

Action des anthirhumatismeaux non stéroïdiens sur le métabolisme du collagène

Cahiers Méd. Lyonnais n° 9, Mars 75, p. 387

95 - UITTO, HANNUKSELA, RASMUSSEN 1970 :

Protocollagene proline hydroxylase activity in scleroderma and other connective tissue disorders

Ann. Clin. Res., 2, 235-239

96-97 - UITTO J., LICHTENSTEIN J.R. :

Defects in the biochemistry of collagen in diseases of connective tissue

J. of Investigative Dermatol, vol. 66, 59-79, 1976

98 - VARADI, CIFONELLI et DORFMAN :

The M.P.S. in normal urine

Biochem. Biophys. Acta 1967, 141, 103

99 - VALLET G., HUC A. et coll. :

Chimie - physique de la molécule de collagène

LYON Médical, 1971, 226, 13, 7-16

100 - VIALARD :

Activité de la N-acétyl-bêta-glucosaminidase dans le L.C.R.
humain
Patho. Bio., vol. 20, Sept. 1972, P. 655

101 - VIELLARD. A., BOREL J.P. :

La biosynthèse du collagène et sa pathologie
Path. Biol. 21, n° 9, 1023-1036, Nov. 1973

102 - VIGNON E. :

Structure et métabolisme du cartilage articulaire
Patho. Bio. n° 19, Août 1971, p. 771

103 - WELLWOOD J.M., ELLIS B.G., PRICE R.G., THOMPSON A.E., HAMMOND K.,
JONES N.F. :

Urinary N-acetyl-bêta-D-glucosaminidase activities in patients
with rural disease
Britisch Med. J., 1975, 3, 408

104 - WELLWOOD J.M., PRICE R.G., ELLIS B.G., THOMPSON A.E. :

A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl-bêta-
glucosaminidase in human urine
Clin. Chim. Acta 69 (1976), 85-91

105 - WELLWOOD J.M., THOMPSON A.E., SIMPSON P.M., TICHE J.R. :

Evidence of gentamycin nephrotoxicity in patients with renal
allografts
Br. Med. J., 1975, 3, 278

106 - WHITELEY J., FRANCIS M.J.O., WALTON R.J., SMITH R. :

Serum proline imino-peptidase activity in normal adult subjects
and in patients with Paget's disease of bone
Clin. Chim. Acta 71 (1976), 157-163

107 - ZITTOUN, BOUSSER et coll. :

Lymphocytic bêta-glucuronidase in the lymphoproliferative syn-
dromes
Biomedicine 1973, 18, 415-420

BIBLIOGRAPHIE COMPLEMENTAIRE D'OUVRAGES DE REFERENCE

108 - C.A. MAUTALEN :

Instituto de Investigaciones Medicas
BUENOS AIRES, 24 Oct. 1973

109 - S. RADOM, M. ZULAWSKI et E. DAHLIG :

Department of clinical chemistry, Institute of Oncology
(Warsaw) Pologne - Fév. 1972

110 - A.E.C. SALEH et J.J. COENEGRACHT :

Clin. Chim. Acta 1968, 21, 445

111 - H.E. JANIN, G.W. FINK, W. WISE, M. ZIFF :

J. Clin. Invest., 1962, 41, 1928

112 - K.I. KIVIRIKKO, O. LAITINEN, B.A. LAMBERG :

Value of urine and serum hydroxyproline in the diagnosis of
thyroïde disease
J. Clin. Endocrinal, Metab., 1965, 25, 1347

113 - E.C. LEROY, E.D. HARRIS, A. SJOERDSMA :

Anal. Biochem., 17, 377

114 - E.C. LEROY :

Dans "Advances in clinical chemistry"
Ac. Press., ed. N.Y., 1967, vol. 10, 213

115 - T.A. DULL, L. CAUSINGS, P.H. HEINEMAN :

Urinary total hydroxyproline as an index of connective tissu
turn-over in bone
J. Clin. Invest., 1962, 41, 1355

116 - F. BOCCI, S. FORCONI :

Hydroxyproline in pregnancy
Biol. Abs., 1966, 47, 66215

117 - J. HUTTON, S. UDENFRIEND et coll. :

Arch. Biochem. Biophy., 1968, 125, 779-85

118 - L. KLEIN, P.H. CURTIS :

Oxford - Blackwell, 1964

119 - J. FREY, P. PADIEU :

Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 1221

120 - K. JUVA et D.J. PROCKOP :

Anal. Biochem., 1966n 15, 341

121 - C.L. ROSANO :

Anal. Biochem., 1966, 15, 341

122 - R.A. GRANT, M. HATHORN, J. GILLMAN :

Biochem. J., 1960, 186, 549

123 - C.W. MOSS, M.A. LAMBERT :

Analysis of hydroxyproline y hydroxylysine by gas chromatography
Analytical Biochemistry, 1974, 59, 259-262

124 - C.B. WILLIAMS, A.C. WINDSOR :

The use of the H.P./creat. Ratio in Ederly Patients
Geront. Clin., 1971, 13, 277-284

125 - R.G. WHITEHEAD :

Hydroxyproline-creatine ratio as an index of nutrition and status
and rates of growth
Lancet, Septembre 1965, 2, 567

126 - K. SCHREIR :

Aminoacids in pre - and past - natal periods in amino acid pools
Holden. Ed., 1962

127 - A.J. BOLET :

Mt Sinaï J. Med., 1970, 37, 445

128 - R. PLAQUET, G. BISERTE, P. BOULANGER :

Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 4, 393-406

129 - A.C. KIBRICK, C.A. HASHIRO, D.J. SAFIER :

Anal. Biochem., 1967, 19, 249

130 - M. GRUSON, A. RYCKEWAERT, D. HIOCO, C. LANHAM et S. de SEZE :

L'hydroxyprolinurie dans les cancers secondaires des os
Patho. Biol., 1966, 14, 210

131 - M. GRUSON, A. RYCKEWAERT, D. HIOCO, C. LANHAM et S. de SEZE :

L'hydroxyprolinurie au cours des cancers secondaires des os
Revue de rhumatisme, Janv. Fév. 1966, 33, 23

132 - L. TOUGAARD :

The degree of mineralization in bone tissue
Scand. J. Clin. Lab. Invest., Déc. 1973, 32

133 - J. MIROUZE, C. JAFFIOL, C. SIMON, L. MONNIER :

L'hydroxypoline dans les maladies thyroïdiennes
Annales.d'endocrinologie, 1971, 32, 132

- 134 - A.M. RECORDIER, G. SERRATRICE, J. EISINGER, P. VALENTE et R. RAGNONI :
Modifications de l'hydroxyprolinurie après thérapeutique à
effet vasculaire
Rhumatologie, 1967, 19, 6-223
- 135 - M.R. STETTEN :
Some aspects of metabolism of hydroxyproline studied with aid
of isotopic nitrogen
J. Biol. Chem., 1949, 181, 31-37
- 136 - D.J. PROCKOP, S. UDENFRIEND :
A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues
and urine
Analyt. Biochem., 1960, 40, 843
- 137 - J.F. WOESSNER :
The determination of hydroxyproline in tissue and protein
samples containing small proportions of this amino acid
Arch. Biochem., 1961, 93, 440-47
- 138 - G.R. HOWELLS, B.A. WHARTON, R.A. MELANCE :
Value of hydroxyproline indices in malnutrition
Lancet, 1967, 1, 1082-83
- 139 - R. ASKENASIS (Université libre de BRUXELLES) :
Urinary excretion of hydroxylysyl glycosides as an index of
collagene metabolism in disease
- 140 - L. KLEIN :
Effect of calcium infusion on urinary hydroxyproline and phos-
phorus in metabolic bone disease (abstract)
Acta. Clin. Res., 1963, 11, 258
- 141 - C.R. JONES et coll. :
J.A.M.A., 17 Mars 1969, 207, 11, 2085
- 142 - D. MATIASEVIC, H. GERSHBERG :
Metabolism
1966, 15, 720
- 143 - W.M. TELLER, U. GENSCHER, H. BURKHART, K. RONNEL :
Hydroxyproline excretion in various form of growth failure
Archives of disease in childhood, 1973, 48, 127-132
- 144 - S. AWARD :
Dysostosis multiplex : review of literature and report of two
cases with unusual manifestations
Arch. Pediat. 78, 184, 1961
- 145 - H.K. BERRY :
Procedures for testing urine specimens dried on filter paper
Clin. Chem. 5, 603, 1959

146 - L. BOLDT :

Beitrag zur Dysostasis multiplex (Von Pfaundler, Hurler)
Z. Kinderheilk 63, 679, 1943

147 - B.S. DANES and A.G. BEARN :

Cellular metachromasia; a genetic marker for studying the muco-
polysaccharidoses
Lancet 1, 241, 1967

148 - B.S. DANES and A.G. BEARN :

Correction of cellular metachromasia in cultured fibroblasts
in several inherited mucopolysaccharidoses
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 357, 1970

149 - A. DORFMAN :

Studies of the biochemistry of connective tissue
Pediatrics 22, 576, 1958

150 - S.R. PINNELL, S.M. KANE et coll. :

A heritable disorder of connective tissue - Hydroxylysine
deficient collagen disease
N. Engl. J. Med. 286, 1013-1020, 1972

=====

